



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**EPIDEMIOLOGIA DA INFEÇÃO POR ROTAVÍRUS EM
HUAMBO, ANGOLA: PREVALÊNCIA DA INFEÇÃO E
DOS GENÓTIPOS CIRCULANTES**

JOANA RITA SANTOS PEREIRA

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA**

MAIO 2014



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR ROTAVÍRUS EM
HUAMBO, ANGOLA: PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO E
DOS GENÓTIPOS CIRCULANTES**

JOANA RITA SANTOS PEREIRA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA

Orientadora: Doutora Claudia Istrate

Coorientadora: Professora Doutora Aida Esteves Simões

Laboratório onde foi realizado o trabalho experimental:

Grupo de Virologia, Unidade de Microbiologia Médica

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

MAIO 2014

Epidemiologia da Infecção por Rotavírus em Huambo, Angola: Prevalência da Infecção e dos Genótipos Circulantes

Direito de ‘Copyright’ cedido pela estudante Joana Rita Santos Pereira da Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Elementos Bibliográficos Resultantes da Dissertação

Pereira J, Esteves A, Fortes FJ, Dimbu PR, Saraiva N, Rosário VE e Istrate C.
Epidemiologia da infeção por rotavírus em Huambo, Angola: prevalência da infeção e dos genótipos circulantes. 2º Congresso Nacional de Medicina Tropical, Lisboa, 22-23 Abril de 2013 (Painel).

Agradecimentos

À Doutora Claudia Istrate, coordenadora da dissertação e Investigadora Auxiliar Convidada da Unidade de Ensino e Investigação de Microbiologia no Instituto de Higiene e Medicina Tropical, pelo seu acompanhamento e auxílio, sempre presente, no decorrer da execução do meu trabalho experimental. Sem a sua persistência e motivação, este trabalho não teria sido realizado.

À Professora Doutora Aida Esteves Simões, Professora Associada da Unidade de Ensino e Investigação de Microbiologia no Instituto de Higiene e Medicina Tropical, pela oportunidade e confiança que me deu para o ingresso neste projeto. Por toda a orientação e cooperação na realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Filomeno de Jesus Fortes, responsável em Angola pelo projeto e aos colaboradores Dr. Pedro Rafael Dimbu e Dr. Nilton Saraiva, do Departamento do Controlo de Doenças da Direção Nacional de Saúde Pública de Angola que financiou o projeto.

Também aos profissionais de saúde angolanos que, nos centros de saúde e hospitais locais, contribuíram para a colheita das amostras e acompanhamento dos pais e crianças, nomeadamente à Dra. Maria Cecília de Almeida e Dra. Marina de Oliveira. Agradecer a participação e consentimento dado pelos pais das crianças incluídas no estudo.

Reconheço o apoio e disponibilidade laboratorial prestada pela minha colega Inês Portinha e Ângela Lopes.

Tenho de agradecer também ao Doutor Johan Nordgren, professor e investigador da Divisão de Virologia Molecular na Universidade Linköpings, Suécia. Devido à sua disponibilidade e auxílio que prestou na análise estatística dos dados.

Naturalmente, um agradecimento especial aos meus pais, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e me motivaram durante todo o processo de realização desta etapa da minha vida.

Resumo

Os rotavírus são considerados a principal causa de gastroenterite aguda (GEA) em crianças menores de cinco anos de idade, afetando especialmente os países em desenvolvimento onde ocorre mais de 90% das mortes atribuídas a este vírus. O presente estudo foi realizado no Huambo, na região central de Angola, um país da África subsaariana com elevada mortalidade por diarreia pediátrica mas sem dados anteriores sobre epidemiologia dos rotavírus. O objetivo deste estudo consistiu em estudar a ocorrência da infecção e genotipar os rotavírus circulantes em crianças (<5 anos) com GEA naquela região de Angola.

Durante o mês de Junho de 2012 (época seca), foram colhidas 246 amostras fecais de crianças com GEA atendidas no serviço da urgência de 3 hospitais municipais (Alto-Hama, Bailundo e Caála) e 3 centros de saúde (Calenga, Casseque III e Mineira) do distrito de Huambo. A realização do teste rápido imunocromatográfico permitiu detetar rotavírus em 37,4% (92/246) das amostras. A presença de rotavírus foi ainda confirmada por métodos de biologia molecular, tendo-se procedido à determinação dos respetivos genótipos pelo ensaio de RT-PCR multiplex e/ou sequenciação/análise filogenética. Observou-se predominância de rotavírus dos genótipos G1P[8] (45,6%) e G1P[6] (34,8%), este último considerado pouco comum. Os genótipos G2P[4], G8P[6], G12P[6] e G9P[6] também foram identificados, embora com frequências mais baixas (1%-5,4%) mostrando uma alta diversidade de estirpes de rotavírus a circular na região.

Com base nos genótipos identificados, as vacinas atualmente usadas deverão, teoricamente, proteger contra >85% dos rotavírus circulantes. Porém, a análise filogenética demonstrou que as linhagens dos genótipos G1, G2 e P[8] são diferentes das estirpes vacinais. Assim, consideramos importante não só a introdução da vacina contra rotavírus na região como também a vigilância das estirpes virais, durante e após o processo, para avaliar a eficácia das vacinas atualmente disponíveis na proteção contra estes vírus.

Palavras-chave: rotavírus, Angola, gastroenterite aguda, prevalência, genótipos.

Abstract

Rotavirus is considered the leading cause of acute gastroenteritis (AGE) in children under five years of age affecting especially the developing countries, where more than 90% of the global death toll attributed to this virus occur. Our study was conducted in a central region of Angola, a sub-Saharan country with high mortality due to pediatric diarrhea, but without any previous data regarding rotavirus epidemiology.

The objective of this study was to detect rotavirus and characterize the circulating strains in the region of Huambo, Angola. Faecal specimens (n=246) were collected during June 2012 (dry season) from children under 5 years of age with AGE attending the pediatric emergency rooms of three hospitals (Alto-Hama, Bailundo e Caála) and three health care centers (Calenga, Casseque III e Mineira) distributed throughout the entire district of Huambo. Rotavirus strains of samples positive by immunochromatographic rapid test were G and P typed by hemi-nested type-specific multiplex PCR and the VP4 and VP7 genes from a subset of samples were further sequenced for phylogenetic analysis. A high prevalence (37.4%) of rotavirus infection was observed. G1P[8] genotype was identified in 45,6% of the rotavirus positive samples, while G1P[6] represented 34.8%. G2P[4], G12P[6], G8P[6], and G9P[6] genotypes were also identified, though with lower frequencies (1%-5,4%), altogether showing a high diversity of circulating rotavirus.

The present study, the first to our knowledge from Huambo, Angola, revealed a high prevalence of rotavirus infection as well as the circulation of a wide diversity of rotavirus genotypes, including the uncommon G1P[6] and genotype lineages different from those included in the approved vaccines. Accordingly, our results underline the need for rotavirus strain surveillance in Angola following vaccine implementation to evaluate its efficacy.

Keywords: rotavirus, Angola, acute gastroenteritis, epidemiology, genotypes.

Índice Geral

Elementos Bibliográficos Resultantes da Dissertação	i
Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice Geral	v
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O Vírus	2
1.1.1. Classificação Taxonómica	2
1.1.2. Morfologia e Estrutura do Virião	3
1.1.3. Organização Genómica	4
1.1.4. Proteínas	6
1.1.5. Ciclo Replicativo	8
1.2. Doença	10
1.2.1. Patogénese	10
1.2.2. Sintomatologia	12
1.2.3. Resposta Imune	14
1.2.4. Diagnóstico	15
1.2.5. Tratamento	16
1.2.6. Prevenção	16
1.3. Epidemiologia e Transmissão	19
1.4. Diversidade e Classificação dos Rotavírus	21
1.4.1. Grupos	21
1.4.2. Sistema de Classificação dos Rotavírus do grupo A	22
1.4.3. Constelações de Genes	23
1.4.4. Prevalência e Distribuição Geográfica de Genótipos	24
1.5. OBJETIVOS DO TRABALHO	28
2. MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1. População do Estudo	30
2.2. Avaliação Clínica e Recolha de Dados	31
2.3. Colheita e Armazenamento de Amostras Biológicas	32
2.4. Detecção de Antígenos Virais	32
2.5. Genotipagem de Rotavírus	33

2.6.	Extração de RNA	35
2.7.	Transcrição Reversa	36
2.8.	Preparação de <i>primers</i>	36
2.9.	Hemi-Nested Multiplex PCR	37
2.9.1.	Amplificação por PCR	38
2.10.	Amplificação por PCR da Sequência Nucleotídica Parcial de VP6	40
2.11.	Eletroforese em Gel de Agarose	41
2.12.	Sequenciação de Produtos PCR e Análise das Sequências	41
2.13.	Análise Estatística	42
3.	RESULTADOS	44
3.1.	Caracterização Demográfica e Clínica da População Estudada	45
3.2.	Prevalência da Infecção por Rotavírus	51
3.3.	Caracterização Epidemiológica da infecção por rotavírus	52
3.4.	Genótipos de Rotavírus determinados por <i>hemi-nested multiplex PCR</i>	53
3.4.1.	Genótipos G	53
3.4.2.	Genótipos P	56
3.4.3.	Combinações de genótipos G e P	59
3.5.	Deteção do gene VP6	60
3.6.	Identificação de Genótipos através da Análise de Sequências Nucleotídicas	60
4.	DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	67
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
6.	ANEXOS	87
6.1.	Formulário de Informação e Consentimento Informado	88
6.2.	Inquérito Epidemiológico	90
6.3.	Resultados obtidos na 1ª e 2ª <i>hemi-nested multiplex PCR</i> a partir das sequências parciais codificantes de VP7 e VP4	91
6.4.	Resultados preliminares obtidos por BLAST após sequenciação dos produtos amplificados de VP4	94
6.5.	Resultados preliminares obtidos por BLAST após sequenciação dos produtos amplificados de VP7	96

Índice de Figuras

Figura 1.1. A) Representação esquemática do corte de uma partícula de rotavírus mostrando a localização dos diferentes componentes virais. B) Fotomicrografia de viriões de rotavírus visualizados por microscopia eletrônica com contrastação negativa	4
Figura 1.2. Padrão eletroforético dos segmentos do genoma de rotavírus do grupo A e respectivas proteínas codificadas	5
Figura 1.3. Representação esquemática do ciclo replicativo dos rotavírus	9
Figura 1.4. Mecanismos causadores de diarreia e vômito por rotavírus	12
Figura 1.5. Número de mortes por rotavírus em crianças com idade < 5 anos, em 2008	21
Figura 1.6. Prevalência das combinações genótípicas G/P a partir da revisão de dados, entre 1996 e 2007, provenientes de seis regiões da OMS	25
Figura 1.7. Combinações genótípicas circulantes em 4 regiões do continente Africano entre 2007 e 2011	27
Figura 2.1. Mapa de África e de Angola com as respectivas Províncias	30
Figura 2.2. Mapa da Província de Huambo e dos respectivos Municípios	31
Figura 2.3. Kit de teste rápido utilizado para a detecção de antígenos de rotavírus	33
Figura 2.4. Fluxograma do procedimento usado na genotipagem de rotavírus.....	34
Figura 2.5. Diagrama das posições dos <i>primers</i> nas sequências codificantes de A)VP7 e B)VP4, específicas para cada genótipo	38
Figura 3.1. Distribuição da prevalência da infecção por rotavírus de acordo com os locais de colheita de amostras em Huambo, Angola (2012)	51
Figura 3.2. Padrão eletroforético dos produtos da 2ª reação <i>hemi-nested multiplex PCR</i> , para identificar os genótipos G a partir da amplificação do fragmento genómico codificador da VP7	55
Figura 3.3. Representação gráfica da prevalência dos genótipos G de rotavírus identificados por <i>hemi-nested multiplex PCR</i> , em crianças < 5 anos do Huambo, Angola (2012)	55
Figura 3.4. Padrão eletroforético dos produtos da 2ª reação <i>hemi-nested multiplex PCR</i> para identificar os genótipos P a partir da amplificação do fragmento genómico codificador da VP4	57
Figura 3.5. Representação gráfica da prevalência dos genótipos P de rotavírus identificados por <i>hemi-nested multiplex PCR</i> , em crianças < 5 anos do Huambo, Angola (2012)	58
Figura 3.6. Análise filogenética das sequências nucleotídicas do gene de VP4 (A) e do gene de VP7 (B) de rotavírus presentes em amostras do Huambo, Angola (2012)	65

Índice de Tabelas

Tabela 1.1. Descrição das proteínas estruturais e não estruturais, e suas funções	7
Tabela 2.1. <i>Primers</i> utilizados para a 1ª e 2ª reações de amplificação da região codificante da proteína VP4	39
Tabela 2.2. <i>Primers</i> utilizados para a 1ª e 2ª reações de amplificação da região codificante da proteína VP7	40
Tabela 2.3. <i>Primers</i> utilizados para a amplificação da região codificante da proteína VP6	41
Tabela 3.1. Distribuição das crianças inquiridas por instituição de saúde na região do Huambo, Angola (2012)	45
Tabela 3.2. Características demográficas da população alvo e relação com a infeção por rotavírus no Huambo, Angola (2012)	46
Tabela 3.3. Características da alimentação da população alvo e relação com a infeção por rotavírus no Huambo, Angola (2012)	46
Tabela 3.4. Características clínicas da população com gastroenterite aguda e relação com a infeção por rotavírus no Huambo, Angola (2012)	47
Tabela 3.5. Duração e frequência médias das características clínicas da população alvo em relação com a infeção por rotavírus no Huambo, Angola (2012)	48
Tabela 3.6. Pontuação média da gravidade dos sintomas clínicos na população alvo em relação à idade e à infeção por rotavírus no Huambo, Angola (2012)	48
Tabela 3.7. Indicadores de malnutrição e relação com a infeção por rotavírus em crianças < 5 anos do Huambo, Angola (2012)	50
Tabela 3.8. Combinações de genótipos G/P de rotavírus, identificados por <i>hemi-nested multiplex PCR</i> , circulantes em Huambo, Angola (2012)	59
Tabela 3.9. Combinações genotípicas de rotavírus circulantes na região de Huambo, Angola	66

Lista de Abreviaturas

ARSN	do inglês <i>African Rotavirus Surveillance Network</i>
BLAST	do inglês <i>Basic Local Alignment and Search Tool</i>
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar, do inglês <i>complementary Desoxiribonucleic Acid</i>
CDC	Centro de Controlo e Prevenção de Doenças, do inglês <i>Center for Disease Control and Prevention</i>
DLP	do inglês <i>double layer particle</i>
DNases	Desoxirribonucleases
dsRNA	cadeia dupla de ácido ribonucleico, do inglês <i>double stranded ribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatos
EDTA	Etilenodiaminotetracetato
ELISA	do inglês <i>Enzyme Lynked Immuno Sorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
F	do inglês <i>forward</i>
GEA	Gastroenterite Aguda
GAVI	do inglês <i>Global Alliance for Vaccines and Immunization</i>
Gnt	Genótipo G não determinado
Gmix	Múltiplos genótipos G por amostra
HS	Alta concentração salina, do inglês <i>Hight Salt</i>
IFN	Interferão
IgA	Imunoglobulina A

ICTV	Comité Internacional de Taxonomia de Vírus, do inglês <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IHMT	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
kDa	Quilodalton
kpb	Quilopares de bases
LS	Baixa concentração salina, do inglês <i>Low Salt</i>
ME	Microscopia Eletrónica
mM	milimolar = 10^{-3} moles
NSP	Proteína não estrutural, do inglês <i>Non Structural Protein</i>
NTPase	do inglês <i>RNA nucleoside triphosphatases</i>
nm	nanómetro = 10^{-9} metro
nt	nucleótidos
NCBI	Centro Nacional para a Informação Biológica, do inglês <i>National Center for Biological Information</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Grelha de leitura aberta, do inglês <i>Open Reading Frame</i>
PABP	proteína de ligação à cauda poli-adenilada
poli(A)	cauda poli-adenilada
pb	pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase de DNA, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pnt	Genótipo P não determinado
Pmix	Múltiplos Genótipos P por amostra
pmol	picomole = 10^{-12} moles

PVI	Péptido Vasoativo Intestinal
RE	Reticulo Endoplasmático
RNases	Ribonucleases
RT-PCR	Reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase de DNA, do inglês <i>Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction</i>
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro, do inglês <i>messenger Ribonucleic Acid</i>
RdRp	RNA dependente de RNA polimerase
R	do inglês <i>reverse</i>
RCWG	Grupo de Trabalho de Classificação do Rotavírus, do inglês <i>Rotavirus Classification Working Group</i>
RV	Rotavírus
RVA	Rotavírus do grupo A
RT	Transcriptase Reversa, do inglês <i>Reverse Transcriptase</i>
SA	ácido N-atecilneuramico
SNE	Sistema Nervoso Entérico
SG	Subgrupo
SD	Desvio padrão, do inglês <i>Standard Deviation</i>
SLP	do inglês <i>single layer particle</i>
TAE	Tris-Ácido Acético-EDTA
TLP	do inglês <i>triple layer particle</i>
VP	Proteínas virais, do inglês <i>Viral Proteins</i>
x g	força g ou força centrífuga relativa (rcf)

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A diarreia e a pneumonia são das principais causas infecciosas de mortalidade infantil em crianças com menos de 5 anos de idade, estimando-se que, em 2011, tenham causado respetivamente 700 000 e 1,3 milhões de mortes nesta faixa etária (1). A gastroenterite aguda (GEA) pode ser causada por vários vírus (*e.g.* rotavírus, calicivírus, adenovírus, astrovírus), bactérias (*e.g.* *Vibrio cholerae*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli*,) e parasitas (*e.g.* *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica*,). Os rotavírus são considerados os principais agentes da GEA, tendo sido responsáveis, a nível global, em 2011, por cerca de 197 000 mortes (2). Os rotavírus humanos foram descobertos em 1973, uma década após a visualização dos primeiros rotavírus animais, quando Ruth Bishop identificou partículas virais, por microscopia eletrónica (ME), em amostras da mucosa duodenal de crianças com diarreia aguda (3). Estes vírus apresentavam uma forma particular semelhante a uma roda dentada, que deu origem ao seu nome (do latim *rota*). Sendo esta designação posteriormente adaptada pelo Comité Internacional de Classificação Taxonómica de Vírus. Pouco tempo depois, em 1973, também através da ME, os rotavírus foram identificados em fezes de crianças com gastroenterite aguda (4, 5). Após esta descoberta, vários investigadores de diferentes países começaram a reportar a presença de rotavírus em fezes de crianças com diarreia severa, sendo rapidamente identificado como o principal agente etiológico de diarreia aguda em crianças, por todo o mundo (6).

Os rotavírus caracterizam-se por uma grande diversidade genética, com base na qual são definidos vários grupos e dentro destes múltiplos genótipos. Nos últimos anos, tem-se registado um aumento na variedade de estirpes circulantes, principalmente em África e Ásia. A prevalência de alguns genótipos varia geograficamente e temporalmente entre países e mesmo dentro de um país. Estes dados levantam alguma preocupação relativamente à eficácia da prevenção desta infeção por vacinação, uma vez que as vacinas existentes têm por base os genótipos mais prevalentes a nível global. Para avaliar esta questão, é essencial a identificação das estirpes circulantes num dado país e a monitorização das mesmas ao longo do tempo, antes e após a introdução da vacina (10, 11, 12).

Em Angola, segundo um estudo publicado em 2010 pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a subnutrição é considerada o maior fator de risco para a saúde e a GEA a principal causa de morte, em crianças de ambos os sexos com idade inferior a 5 anos. A inexistência de dados epidemiológicos referentes à infeção por rotavírus neste país, impossibilita a compreensão da dimensão deste agente como causa de diarreia aguda em crianças, nesta faixa etária (13).

No presente trabalho estimou-se a ocorrência da infeção e identificaram-se as principais estirpes de rotavírus circulantes num distrito administrativo de Angola, o Huambo. Os genótipos encontrados na amostragem realizada representam a primeira caracterização das estirpes de rotavírus que circulam nesta região e em Angola. Os resultados deste estudo piloto de epidemiologia dos rotavírus, numa região do país conhecida por prevalência elevada das doenças diarreicas em crianças até aos 5 anos, deverá servir de linha de base à avaliação da vacina a ser introduzida em 2014.

1.1. O Vírus

1.1.1. Classificação Taxonómica

Os rotavírus pertencem ao género *Rotavirus*, um dos quinze membros da família *Reoviridae*. Esta família, cujo nome deriva de “*Respiratory Enteric Orphan*”, foi criada em 1959 para incluir vírus identificados nas mucosas, respiratória e intestinal, sem estarem associados a doença conhecida e por isso designados “*orphan virus*”. Esta ideia está ultrapassada atualmente mas a designação permaneceu. Os quinze géneros apresentam como características comuns partículas virais icosaédricas, com várias camadas proteicas, sem invólucro e um genoma de dupla cadeia de ácido ribonucleico (dsRNA) composto por 10-12 segmentos maioritariamente monocistronicos (7, 8).

1.1.2. Morfologia e Estrutura do Virião

As partículas virais maduras dos rotavírus são esféricas (~100 nanômetros (nm) de diâmetro), sem invólucro, com simetria icosaédrica (T=13) e constituídas por três camadas proteicas concêntricas “*triple layer particle*” (TLP) (Figura 1.1.) (80).

A camada interna é composta por 120 cópias da proteína estrutural VP2 (~102 quilodaltons (kDa)) que envolve o genoma viral e complexos enzimáticos, constituindo as partículas de camada única “*single layer particle*” (SLP), ~37-40 nm de diâmetro (80). Os complexos enzimáticos, constituídos pela RNA-polimerase viral (VP1, ~125 kDa) e pela enzima de *capping* guanilil-transferase (proteína estrutural VP3, ~88 kDa), estão associados a cada um dos segmentos genômicos e localizam-se na proximidade dos vértices da cápside (8).

A camada intermédia é constituída por 260 trímeros da proteína estrutural VP6 (~45 kDa) que serve de âncora às proteínas da camada externa (8, 14). As partículas virais com estas duas camadas “*double layer particle*” (DLP), ~55 nm de diâmetro (80), são transcricionalmente ativas e não infecciosas, contrariamente às TLPs.

A camada externa, estabilizada por íons cálcio, consiste em 260 trímeros da glicoproteína VP7 (~34 kDa) de onde se projetam cerca de 60 espículas de trímeros da proteína VP4 (~84 kDa) sensível a proteases. Estas espículas possuem dois domínios externos globulares, um corpo central e um domínio interno globular inserido na camada de VP7. A tripsina intestinal corta proteoliticamente VP4 em duas proteínas, VP8* (28 kDa, N-terminal) e VP5* (60 kDa, C-terminal), que se mantêm associadas no virião. VP8* liga-se aos recetores celulares, enquanto VP5* apresenta uma região hidrofóbica com propriedades fusogénicas e está envolvida na penetração das membranas celulares (15).

Nos 12 eixos de simetria icosaédrica existem canais que atravessam as três camadas proteicas. Estes canais permitem a importação de metabolitos necessários para a transcrição do genoma viral e a exportação dos transcritos de ácido ribonucleico (RNA) viral (8, 14, 16).

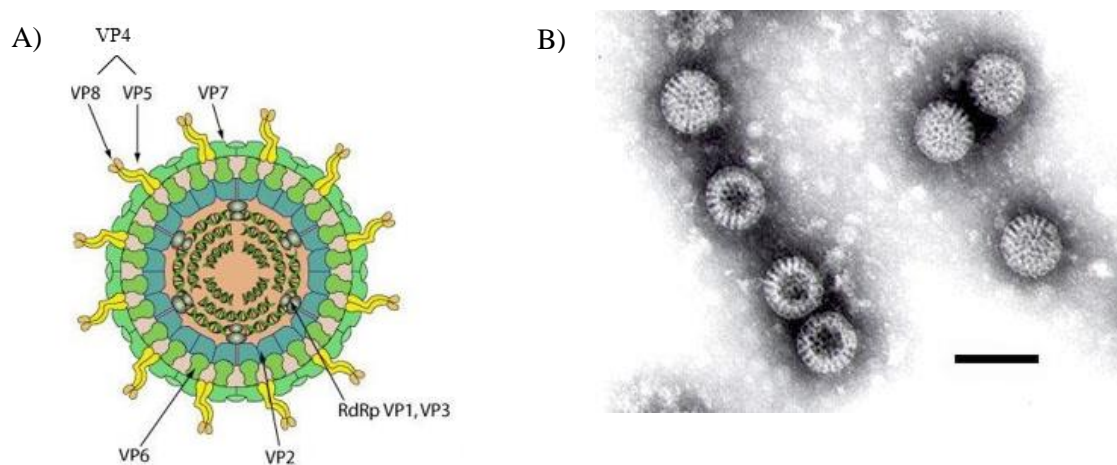


Figura 1.1. A) Representação esquemática do corte de uma partícula de rotavírus mostrando a localização dos diferentes componentes virais. Adaptado de (17). B) Fotomicrografia de viriões de rotavírus visualizados por microscopia eletrônica com contrastação negativa. A barra representa 100 nm (77).

1.1.3. Organização Genômica

O genoma dos rotavírus é constituído por 11 segmentos RNA de dupla cadeia (dsRNA), que variam em tamanho entre 0,7 e 3,3 quilopares de bases (kpb). Os segmentos genéticos, identificados de 1 a 11, são todos monocistrônicos com exceção do segmento 11 que é policistrônico nos rotavírus do grupo A (RVA). No total estes segmentos codificam 12 proteínas virais, seis estruturais (*Viral Proteins* – VP) e seis não estruturais (*Non Structural Proteins* - NSP) (8).

Quando analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida, os segmentos genômicos dos RVA surgem agrupados, segundo o seu tamanho médio, em 4 grupos: de 1 a 4, com elevada massa molecular; seguindo-se dois segmentos com tamanho intermédio, 5 e 6; depois um tripleto distinto de segmentos, 7 a 9, com dimensões menores e muito próximas e dois segmentos mais pequenos 10 e 11 (Figura 1.2.). A não observação deste padrão eletroforético pode significar que estamos perante rotavírus do grupo A de aves ou vírus que sofreram rearranjos dos segmentos genômicos individuais ou mesmo rotavírus que não são do grupo A (8, 14).

A cadeia de RNA com polaridade positiva inicia-se com um resíduo de guanina na extremidade 5', seguindo-se uma sequência não traduzida (5'UTR), uma grelha de leitura aberta (ORF) e uma sequência não traduzida (3'UTR) que termina com dois resíduos de citosina em 3'.

Os transcritos de polaridade positiva possuem 5' *cap* e não têm cauda poli(A) 3'. No entanto possuem uma sequência de consenso (3'CS) UGUGACC particularmente importante para a regulação da tradução dos transcritos virais nas células infectadas. Estas sequências funcionam ainda como promotores da síntese do RNA viral de polaridade negativa (18). As UTRs 5' e 3' apresentam regiões de complementaridade dando origem a transcritos virais com estrutura em cabo de frigideira. Excetuando 3'CS, as sequências das UTRs 5' e 3' variam de segmento para segmento funcionando, provavelmente, como sinais que asseguram a distribuição e encapsidação dos diferentes segmentos (18, 19).

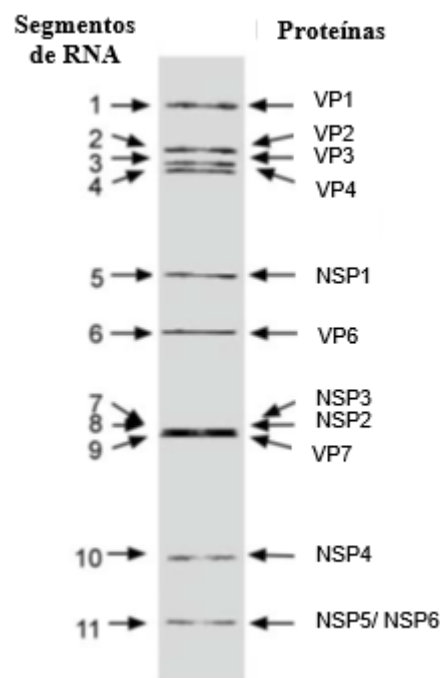


Figura 1.2. Padrão eletroforético dos segmentos do genoma de rotavírus do grupo A (4, 2, 3, 2) e respectivas proteínas codificadas. Adaptado de (14)

1.1.4. Proteínas

Os RVA codificam seis proteínas estruturais (VP1-4, VP6 e VP7) e seis proteínas não estruturais (NSP1-6). As siglas VP e NSP são seguidas de um número árabe que é atribuído por ordem decrescente da massa molecular. As proteínas estruturais constituem a tripla cápside do virião, enquanto as não estruturais são essenciais para a replicação do genoma viral, morfogénese do virião e controlo da resposta inata do hospedeiro (8, 14, 20). Na Tabela 1.1 estão listadas as diferentes proteínas virais com as principais características e funções.

Tabela 1.1. Proteínas estruturais e não estruturais dos rotavírus e respetivas funções.

Segmento Genético	Proteína	Massa Molecular (kDa)	Localização no Virião (nº de cópias)	Propriedades Funcionais
1	VP1	125	Nucleóide/core (12)	- RNA-polimerase dependente de RNA (RdRp); - Ligação específica ao RNA viral;
2	VP2	102	Camada Interna (120)	- Ligação ao RNA; - Essencial para a replicação viral.
3	VP3	88	Nucleóide/core (12)	- Forma um complexo de transcrição com VP1; - Guanililtransferase e Metiltransferase.
4	VP4 (VP5*+VP8*)	87 (60+28)	Espículas da camada externa (180)	- Ligação aos receptores celulares; - Penetração das membranas celulares - Indução de anticorpos neutralizantes; - O corte proteolítico aumenta a infeciosidade do virião; - Classificação de serótipo ou genótipo P.
5	NSP1	59	Não Estrutural	- Antagonista da resposta antiviral inata (IFN). - Não é essencial para a replicação do vírus em culturas celulares
6	VP6	45	Camada Intermédia (780)	- Confere estabilidade ao virião; - Sequências conservadas permitem a classificação em Grupos e Subgrupos.
7	NSP3	36	Não Estrutural	- Ligação específica ao ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) viral facilitando a sua tradução e inibindo a acção de nucleases. Inibição da tradução das proteínas celulares.
8	NSP2	35	Não Estrutural	- RNA nucleoside triphosphatases (NTPase), e helicase; - Envolvida na formação dos viroplasmata. - Antagonista da resposta antiviral inata.
9	VP7	34	Camada Externa (780)	- Glicoproteína; - Indução de anticorpos neutralizantes; - Classificação em serótipo e genótipo G.
10	NSP4	20	Não Estrutural	- Glicoproteína; - Morfogénese; - Enterotoxina; - Viroporina; - Mobilização de Ca ²⁺ (cálcio), secreção de Cl ⁻ (cloretos) e redução da absorção de glicose pelas células intestinais.
11	NSP5	28-32	Não Estrutural	- Fosfoproteína O-glicosilada; - Autocinase; - Associa-se a NSP2 na formação dos viroplasmata; - Essencial na replicação viral.
	NSP6	12	Não Estrutural	- Função mal conhecida

1.1.5. Ciclo Replicativo

No hospedeiro natural, os rotavírus infetam, essencialmente, os enterócitos maduros presentes nas vilosidades intestinais do jejuno e íleo (15). Para isolamento e replicação em laboratório, usa-se frequentemente as linhas celulares MA104 (rim de macaco verde africano) e Caco-2 (adenocarcinoma do cólon humano), fazendo tratamento prévio do inóculo viral com tripsina (24, 25, 52).

Na Figura 1.3 está apresentado um esquema dos principais passos do ciclo replicativo dos rotavírus. A infeção das células suscetíveis requer o reconhecimento e ligação das partículas virais a recetores celulares. VP8*, o domínio globular das espículas resultante da proteólise da proteína externa VP4, é responsável pela interação com os recetores celulares e ligação do vírus à célula. Vários estudos sugerem que para entrar na célula os rotavírus utilizam múltiplos domínios proteicos da superfície viral, estes interagem com diversas moléculas da membrana plasmática que atuam como recetores celulares, incluindo gangliósidos, integrinas e proteínas de choque térmico localizadas em *lipid rafts* (26, 27, 28), segundo um processo complexo consistindo em vários passos sucessivos (29, 30).

O mecanismo de entrada dos vírus sem invólucro está mal estabelecido. Aparentemente, a via de internalização dos rotavírus é a endocitose independente de clatrina ou de caveolina (31). Nos endossomas, na presença de concentrações baixas de Ca^{2+} , os viriões (TLPs) perdem VP7 e dão origem a partículas com apenas duas camadas (DLPs) que são translocadas para o citoplasma, com envolvimento de VP5* na permeabilização da membrana do endossoma. A perda da camada externa e a libertação no citossol ativam o complexo enzimático interno, constituído por RdRp (VP1) e guanililtransferase e metiltransferase (VP3) virais, que transcreve (+)RNA com 5'cap a partir dos 11 segmentos de dsRNA genómico. Os (+)RNAs virais são extrudidos para o citoplasma através de 12 canais localizados nos vértices das partículas subvirais (DLPs), atravessando as camadas proteicas de VP2 e VP6. Os (+)RNAs vão servir como mRNA para a síntese de proteínas virais ou como matriz para a síntese de (-)RNA durante a replicação do genoma viral (Figura 1.3).

A tradução ocorre nos polissomas celulares. Os mRNAs virais, sem cauda poli(A), possuem a sequência consenso no extremo 3' (3'CS) que se liga ao domínio N-terminal da NSP3.

Esta proteína atua como homólogo funcional da proteína de ligação a poli(A) (PABP) e o seu domínio C-terminal interage com o fator de iniciação da tradução eIF4G, de forma a permitir a circularização dos mRNAs e a ligação destes aos ribossomas para a síntese de proteínas virais (18).

As proteínas NSP2 e NSP5 interagem e vão dar origem a grandes inclusões citoplasmáticas, os viroplasmas, que sequestram os componentes necessários para a síntese e encapsidação do genoma viral e formação da dupla cápside (DLP) (32) (Figura 1.3). A replicação do genoma viral requer a associação de VP1, VP3 e posteriormente de VP2, NSP2 e NSP5 aos diferentes segmentos de (+)RNA, formando-se um nucleóide (*core*) intermediário de replicação que sintetiza (-)RNA tendo como molde (+)RNA encapsidado e dá origem aos 11 fragmentos de dsRNA genómico. O nucleóide revestido externamente por VP2 vai receber trímeros de VP6, dando origem a partículas subvirais DLPs.

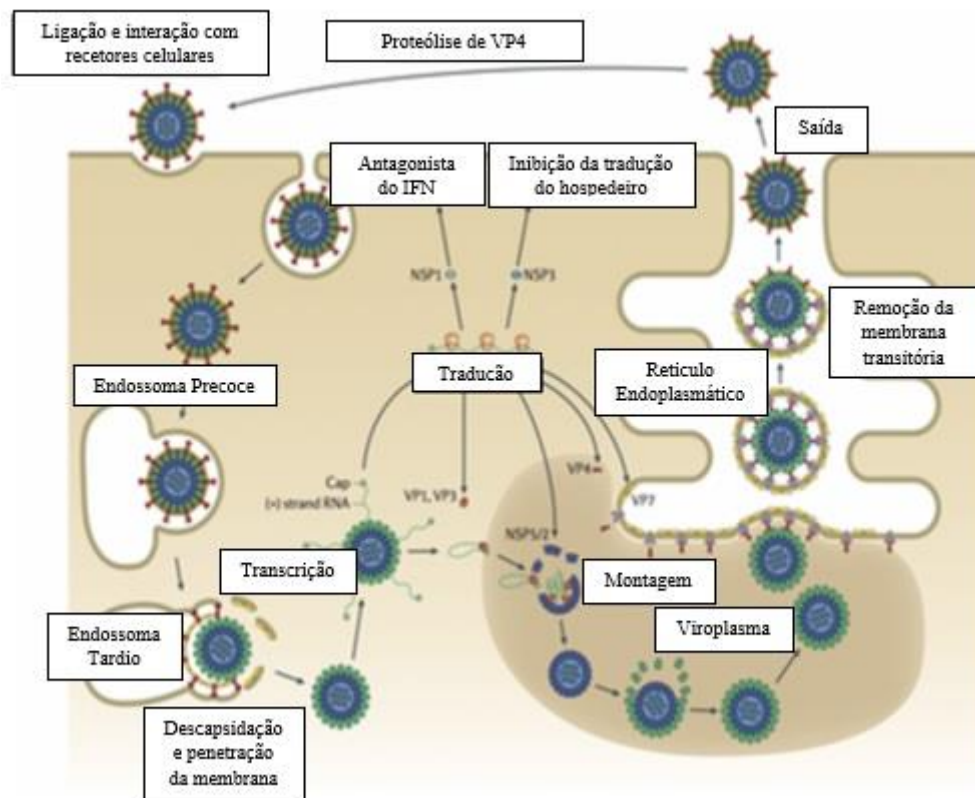


Figura 1.3. Representação esquemática do ciclo replicativo dos rotavírus. Adaptado de (18).

Um dos aspetos menos conhecidos da replicação dos rotavírus é o processo de aquisição da cápside externa. Este processo implica que as DLPs deixem o viroplasma, se associem a VP4 e gemulem através da membrana do retículo endoplasmático (RE) para terem acesso às glicoproteínas VP7. No modelo correntemente aceite, NSP4 acumulada na membrana do RE recruta as DLPs e VP4 para a face citossólica do RE, seguindo-se a gemulação para o lúmen, remoção da membrana transitoriamente adquirida e aquisição de VP7, o mecanismo destes dois últimos passos ainda é desconhecido (18). Os novos vírus são libertados da célula aparentemente por dois mecanismos diferentes, dependendo do tipo de células infetadas. Enquanto nas células despolarizadas a lise parece ser o mecanismo usado, nas células polarizadas do epitélio intestinal os vírus saem na superfície apical, por exocitose, através de uma via secretória alternativa que não envolve o Golgi (15, 18, 32) (Figura 1.3). Os vírus libertados são expostos a proteases do tipo tripsina presentes no trato gastrointestinal, resultando no processamento proteolítico de VP4 para produzir viriões infecciosos.

1.2. Doença

1.2.1. Patogénese

Os rotavírus causam diarreia grave e vômito, com perda excessiva de fluidos e eletrólitos, que podem conduzir à morte. Apesar da sua importância clínica e dos estudos realizados ao longo de várias décadas, o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes a esta doença é limitado. Com base em modelos experimentais desenvolvidos nos últimos dez anos, foram propostos vários mecanismos para a diarreia aquosa associada à infeção por rotavírus, tais como: má absorção (iões e/ou solutos e água), maior secreção, maior permeabilidade e alteração da motilidade (81) (Figura 1.4).

De entre os mecanismos de diarreia, a motilidade é o menos estudado, ainda que a alteração da motilidade tenha sido considerada um fator importante na génese da diarreia. Sabe-se que o sistema nervoso entérico (SNE) possui neurónios da mucosa e mioentéricos, os quais controlam a secreção e a motilidade gastrointestinal, sendo igualmente críticos para a integração do transporte intestinal de eletrólitos através da motilidade.

Frequentemente, as diarreias são tratadas com fármacos tais como Imodium (Loperamida), um agonista dos receptores de opióides que atenua a atividade do plexo mioentérico (88) resultando na atenuação da motilidade intestinal mas não da secreção de eletrólitos ou de água. Ao investigar o papel das prostaglandinas (PGs) na motilidade intestinal em diferentes modelos animais (ratos, cobaias) (89) demonstrou-se o seu papel no controlo de diferentes tipos de músculos lisos (90). Existe um número reduzido de estudos (um em crianças e outros em leitões gnotobióticos) que sugerem que as PGs sejam mediadores do mecanismo da diarreia por rotavírus (126, 127).

Os vários fatores envolvidos na diarreia aquosa incluem infecção citolítica, atrofia das vilosidades, hiperplasia das criptas, a enterotoxina NSP4, o sistema nervoso entérico (SNE), a permeabilidade paracelular e a expressão de enzimas digestivas (81). O papel do SNE na secreção de fluidos e eletrólitos na diarreia por rotavírus foi estudado, tendo sido demonstrado que este é ativado durante a infecção, estimulando a secreção de água e eletrólitos (91). Outros estudos sobre os mecanismos subjacentes à ativação dos neurónios entéricos e à secreção de fluidos induzidos por rotavírus revelaram que certos neurotransmissores (serotonina (5-HT)) e o péptido vasoativo intestinal (PVI) estão implicados na ativação da diarreia (92) e o seu efeito poderá ser atenuado por antagonistas (81). Ao contrário do Homem, os pequenos mamíferos adultos mas não os jovens (e.g. murganhos, coelhos, ratos) são resistentes à diarreia por rotavírus e este facto levou ao estudo dos mecanismos fisiopatológicos da diarreia restringida pela idade nos modelos animais (*i.e* murganho jovem *versus* adulto).

Durante muito tempo pensou-se que a infecção por rotavírus estava confinada ao intestino, porém alguns estudos demonstraram a ocorrência de virémia (33, 34) e, raramente, antigénios virais em líquido cefalorraquidiano (35).

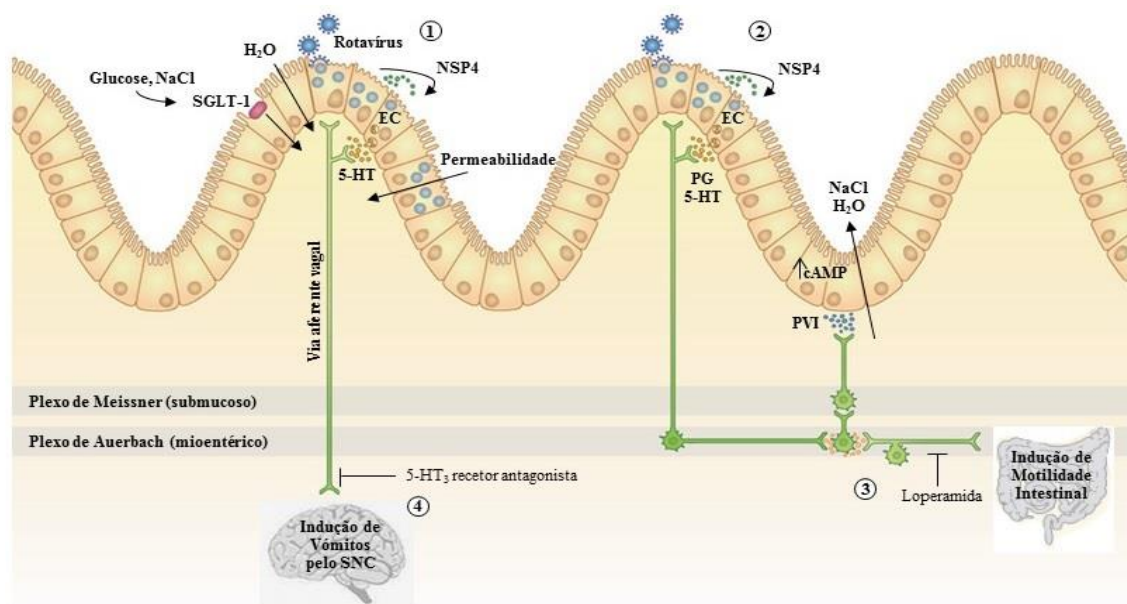


Figura 1.4. Mecanismos causadores de diarreia e vômito por rotavírus. (1) Lesões irregulares, atrofia da vilosidade intestinal. A atividade das dissacaridases fica moderadamente diminuída nas células infectadas com rotavírus. (2) Produção da enterotoxina NSP4 extracelular estimula a liberação da serotonina (5-HT) pelas células de enterocromafina e ativação dos nervos aferentes. Os enterócitos e as células de enterocromafina infectadas com rotavírus determinam produção de prostaglandinas (PG). (3) O plexo nervoso submucoso está associado a secreção de água e eletrólitos enquanto o plexo mioentérico estimula principalmente a motilidade intestinal. (4) A infecção por rotavírus estimula aferentes vagais para o centro do vômito do sistema nervoso central (SNC). Adaptado de (93).

1.2.2. Sintomatologia

A infecção por rotavírus do grupo A pode originar infecção sintomática ou assintomática, dependendo de fatores virais e do hospedeiro. Em relação ao hospedeiro pode-se citar a idade, registrando-se a maior suscetibilidade entre 3 meses e 2 anos de idade (16), e a presença de uma enzima FUT2 funcional (*i.e.*, estatuto secretor) (36, 37). A virulência viral tem sido essencialmente associada aos genes codificadores de NSP1 (antagonista do interferão) e NSP4 (regulador da homeostasia do cálcio e enterotoxina) do vírus (16). O espectro clínico da infecção por rotavírus é amplo e surge rapidamente após um período de incubação de 1 a 3 dias, dependendo do inóculo de vírus infeccioso. Tipicamente, a sintomatologia inicia-se abruptamente com febre pouco elevada, vômitos e dor abdominal, seguidos de diarreia aquosa sem cor e sem sangue durante 5 a 10 dias.

No entanto podem seguir-se complicações, como diarreia crónica (duração superior a 14 dias), intolerância à lactose, malnutrição e até morte (82). As situações fatais, raras nos países industrializados, são devidas normalmente ao desequilíbrio eletrolítico e à desidratação grave que ocorrem devido à perda rápida e prolongada de líquidos e à não reposição dos mesmos de forma assistida (38, 39). No sentido de caracterizar de forma objetiva a gravidade clínica dos episódios de diarreia, nomeadamente tendo em vista a análise de estudos de eficácia de vacinação contra rotavírus, foram propostas escalas numéricas baseadas no somatório de pontos atribuídos aos vários sinais e sintomas clínicos (40, 41).

Os sintomas clínicos são fortemente influenciados pela idade, ocorrendo os sinais mais graves após infeção primária em crianças com idade inferior a 2 anos. No entanto, em recém-nascidos as infeções por rotavírus são frequentemente assintomáticas, possivelmente devido à presença de anticorpos maternos contra rotavírus.

Podem ocorrer reinfeções ao longo da vida, mas normalmente estas são assintomáticas ou com sintomas ligeiros (19). Durante o primeiro episódio de infeção, as partículas virais são excretadas em grandes concentrações, nas fezes, de forma contínua durante 5 a 10 dias, podendo durar um ano ou mais em crianças imunocomprometidas (38).

1.2.3. Resposta Imunitária

No Homem e animais suscetíveis, a infecção por rotavírus induz resposta imune inata e adquirida dos tipos humoral e celular (16). Estudos realizados em murganhos infectados demonstraram a indução da expressão de interferão (IFN) tipo I e tipo III (IFN- λ) e que o tratamento dos animais com IFN- λ , e em menor grau com IFN tipo I, reduzia a replicação viral (42). A importância do IFN na limitação da replicação viral é ainda suportada pelo mecanismo de evasão viral à resposta do IFN mediada pela proteína viral NSP1 (43, 44).

Dois estudos longitudinais, que seguiram crianças ao longo dos dois primeiros anos de vida relativamente à infecção por rotavírus, demonstraram que uma primeira infecção por rotavírus tipicamente resulta em GEA, mas que se desenvolve proteção contra subsequentes infecções por este vírus, com um risco progressivamente menor de doença (45, 46). Observou-se ainda que as infecções sintomáticas e assintomáticas conferiam graus semelhantes de proteção e que a imunidade humoral estava correlacionada com a proteção. Com a serotipagem e genotipagem compreendeu-se que os episódios subsequentes de GEA por rotavírus eram na sua maioria causados por serótipos/genótipos distintos, *i.e.* vírus heterotípicos, e que a proteção estava relacionada com os níveis de anticorpos neutralizantes contra vírus homotípicos (16). A presença de níveis elevados de imunoglobulinas A (IgA) neutralizantes específicos das proteínas VP4 e VP7 nas fezes está correlacionada com proteção (47). Estes anticorpos podem ser igualmente encontrados no soro e frequentemente são usados como medida da imunogenicidade das vacinas contra rotavírus (48, 49). Curiosamente, a proteína VP6 dos rotavírus induz anticorpos não neutralizantes que podem, no entanto, mediar proteção (50).

Estudos em murganhos demonstraram também que os linfócitos B são determinantes na proteção contra a reinfeção, enquanto os linfócitos T CD8⁺ são responsáveis pela redução dos sintomas e da duração da infecção (16). No ser humano, o papel da imunidade celular na infecção por rotavírus encontra-se pouco estudado.

1.2.4. Diagnóstico

O diagnóstico de GEA por rotavírus com base nos sintomas não é possível, pois o quadro clínico é semelhante à GEA com outras etiologias. Assim, o diagnóstico da infecção por rotavírus depende da identificação do agente etiológico em produtos biológicos. As amostras fecais, devido à presença de partículas virais em grandes concentrações, são naturalmente o produto usado.

As partículas virais de rotavírus são facilmente observadas e identificadas em amostras fecais por ME, a técnica original de diagnóstico (51). Apesar da especificidade, a necessidade de infraestruturas e técnicos especializados tornam esta técnica dispendiosa e inadequada para o diagnóstico de rotina de um grande número de amostras. No entanto, ainda é usada para rotavírus não pertencentes ao grupo A.

Para a deteção de rotavírus, de um modo geral, recorre-se a imunoensaios comerciais que permitem detetar antigénios de rotavírus diretamente em amostras fecais. Estes podem ser imunoensaios enzimáticos do tipo *Enzyme Lynked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) ou ensaios imunocromatográficos no formato de teste rápido e utilizam anticorpos contra VP6 do grupo A. A sensibilidade e especificidade destes testes é elevada (>95%). Os testes de aglutinação de partículas de látex, apesar do uso fácil, são menos sensíveis. A transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), tendo como alvo um fragmento do gene da proteína VP6 (70), é considerada o *gold standard* e usada na confirmação dos resultados dos imunoensaios. O ensaio de RT-PCR é altamente sensível na deteção de pequenas quantidades de vírus, sendo também usado na identificação de estirpes através da amplificação de outras regiões do genoma viral (51).

O isolamento de rotavírus a partir de amostras clínicas é difícil e requer o tratamento das amostras com tripsina e incorporação de pequenas quantidades desta enzima no meio de cultura. As linhas celulares mais frequentemente usadas são MA104 e CaCo-2 (25, 52).

1.2.5. Tratamento

Presentemente não existem fármacos antivirais específicos para o tratamento da infecção por rotavírus. Tal como para as diarreias com outra etiologia, o tratamento baseia-se na reposição das perdas de água e eletrólitos, através da administração de soluções de reidratação oral (SRO) de baixa osmolaridade, contendo glicose e eletrólitos (sódio, potássio, cloreto, citrato) em proporções bem definidas e recomendadas pela OMS. Os casos de desidratação grave podem requerer reidratação intravenosa. É ainda aconselhada a administração de um suplemento de zinco para diminuir a gravidade e duração da diarreia (53). Nos últimos anos, a combinação do tratamento indicado pela OMS com a prevenção por vacinação, conseguiu reduzir de maneira significativa a mortalidade e morbilidade infantil causada por rotavírus nos países mais afetados.

1.2.6. Prevenção

Os rotavírus têm uma enorme capacidade de resistência ambiental, esta característica, aliada à facilidade de transmissão do vírus, faz com que todos os cuidados de higiene implementados, sistemas de saneamento básico e de segurança alimentar, não sejam suficientes para diminuir a morbilidade e mortalidade a nível mundial. Isto é demonstrado pela elevada incidência da doença registada em países mais desenvolvidos, que apesar de possuírem uma taxa de mortalidade reduzida ainda apresentam uma taxa de hospitalizações elevada devido à infecção por rotavírus. Devido à inexistência de um tratamento específico contra a infecção por rotavírus, a prevenção da doença através da vacinação é essencial para o controlo da transmissão viral.

O desenvolvimento de vacinas contra os rotavírus começou no início da década de 80 e seguiu uma abordagem jennneriana com a utilização de estirpes de rotavírus animais, vacinas monovalentes de origem bovina (RIT 4237 e WC3) ou símia (rotavírus de macaco rhesus, RRV). Estas estirpes, naturalmente atenuadas, não causavam doença no Homem mas conferiam proteção contra infecção subsequente por rotavírus humanos. Ensaios clínicos realizados com esta primeira geração de vacinas revelaram resultados de eficácia com alguma inconsistência nos países industrializados (82%-100%), mas sobretudo fraca proteção nos países em vias de desenvolvimento (54).

No sentido de aumentar o potencial imunogénico e desencadear uma resposta imunológica semelhante à da infeção natural, através da redistribuição de segmentos genómicos, foram geradas estirpes de vírus com um complemento genético maioritariamente animal mas expressando os genes das proteínas VP7 ou VP4 humanas. Surgiu assim uma vacina multivalente consistindo em vírus de macaco rhesus, expressando a proteína VP7 dos genótipos G1, G2 e G4 humanos e G3 de macaco rhesus. Esta vacina, designada RotaShield® (Wyeath, Estados Unidos da América (EUA)), após extensos estudos de segurança e eficácia foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA), em 1998. No ano seguinte, depois de aproximadamente 1,5 milhões de doses terem sido administradas em crianças com menos de um ano de idade nos Estados Unidos, a vacina foi retirada de circulação pela suspeita de associação com quadros de invaginação intestinal (55).

Em 2006, duas novas vacinas orais contra rotavírus foram licenciadas nos EUA, União Europeia e muitos países da América Central e do Sul. Numa destas vacinas a estirpe de rotavírus bovino WC3 foi usada na obtenção de 5 vírus expressando individualmente VP7 dos genótipos G1-4 e VP4 do genótipo P[8] de rotavírus humanos. Esta vacina pentavalente, RotaTeq (Merck, EUA), requer a administração de 3 doses, sendo a primeira administrada nas 6-12 semanas de idade e as doses subsequentes com intervalos de 4-10 semanas. Nos EUA, a vacinação foi associada a um atraso substancial do início da época do ano de maior prevalência de casos de infeção e a um decréscimo da atividade dos rotavírus em 50%. Na Europa e nos Estados Unidos observou-se 98% de eficácia na prevenção de diarreia grave por rotavírus, enquanto na Nicarágua foi de apenas 46% (56, 54).

A segunda vacina licenciada, Rotarix (GlaxoSmithKline Biologicals, Bélgica), é uma vacina monovalente de rotavírus humano G1P[8], atenuado através da passagem em culturas celulares de rim de macaco. As duas doses são administradas com um intervalo ≥ 4 semanas e a primeira deve ser administrada a crianças ≥ 6 semanas de idade.

Os ensaios clínicos revelaram 96% de eficácia contra doença grave por rotavírus na Europa e valores mais baixos nos países em vias de desenvolvimento (85% na América Latina, 77% na África do Sul e 49% no Malawi) (57, 58).

Curiosamente, apesar da natureza monovalente, Rotarix parece conferir proteção heterotípica, ainda que em menor grau.

Uma revisão Cochrane recente descreve eficácia semelhante das duas vacinas na prevenção de doença grave por rotavírus em crianças com idade inferior a 2 anos em países de baixa mortalidade (82% e 85%) e de alta mortalidade (41% e 42%) e ausência de associação a efeitos adversos, incluindo invaginação intestinal (59).

As hipóteses para explicar as diferenças de eficácia das vacinas contra rotavírus observadas entre países desenvolvidos e países de média e baixa renda são múltiplas (54). Uma vez que o grau de proteção conferido pelas vacinas orais atenuadas depende do título das estirpes vacinais e do número de doses administradas, fatores do hospedeiro e ambientais que reduzam a dose efetiva de vírus na vacina deverão também reduzir a sua imunogenicidade. Os níveis de anticorpos transplacentários adquiridos da mãe, os componentes imunes e não imunes do leite materno e a quantidade de ácido gástrico da criança podem baixar a quantidade de vírus que chega ao intestino. Por outro lado, a resposta do hospedeiro pode ser diminuída por fatores tais como malnutrição (e.g. deficiência em zinco e vitamina A), interferência da flora intestinal e estado de saúde do hospedeiro (e.g. diarreia, infecção pelo HIV). Finalmente, diferenças na epidemiologia do vírus e na distribuição de genótipos/serótipos podem também alterar o sucesso da vacina (60).

Apesar de a eficácia ser mais baixa nos países de baixos recursos, devido ao número elevado de casos de diarreia por rotavírus, o benefício absoluto da vacina é relevante nestes países. Assim, em 2009 a OMS recomendou a implementação da vacina contra rotavírus a nível mundial (57). Até 2013, 43 países introduziram a vacinação contra rotavírus no seu programa nacional de vacinação e 3 países inseriram em programas regionais (61). Para colmatar as dificuldades de acesso à vacina, a *Global Alliance for Vaccines and Immunisation* (GAVI Alliance) lançou um programa de apoio para países de baixos recursos.

Entre 2008 e 2009, a Nicarágua, a Bolívia, a Guiana e as Honduras foram os primeiros países a beneficiar dos fundos da GAVI para implementação das vacinas contra rotavírus e em 2011, a vacinação foi introduzida nos programas de imunização nacional em mais 8 países, 3 países Asiáticos e 5 Africanos.

Em 2013, foram aprovados mais 34 países, entre os quais Angola, para receberem fundos de suporte à implementação de vacinas contra rotavírus (62).

Outras formulações de vacinas contra rotavírus baseadas em vírus recombinantes obtidos por redistribuição de segmentos entre estirpes animais e humanas, bem como em novas estirpes neonatais atenuadas, estão em ensaios clínicos (12). Ainda, devido aos potenciais problemas associados à vacinação com vírus atenuados, designadamente em crianças com imunodeficiência, estão a ser desenvolvidas vacinas baseadas em partículas virais sem genoma (*virus-like particles*) (83) ou com genoma viral inativado (12).

1.3. Epidemiologia e Transmissão

O desenvolvimento de testes de diagnóstico simples, sensíveis e pouco dispendiosos e a presença de rotavírus em grandes quantidades nas fezes durante a fase aguda da doença, facilitou desde cedo o estudo da epidemiologia da infeção por rotavírus. Os primeiros trabalhos realizados em crianças hospitalizadas por diarreia em países industrializados, situados em países temperados, identificaram rotavírus em 35-50% das crianças com menos de 5 anos. Estes casos ocorriam maioritariamente durante o Inverno e a faixa etária mais atingida era entre os 6 e os 24 meses, 40% dos casos sendo em crianças com menos de um ano (63).

Estudos semelhantes realizados em países de baixa renda, maioritariamente em regiões tropicais, revelaram uma infeção mais precoce (80% com menos de 1 ano de idade) e uma sazonalidade menos distinta das infeções ou nula até latitudes de 10° (64).

O espectro sazonal e geográfico da infeção por rotavírus é compatível com transmissão fecal-oral e respiratória. Durante a infeção por rotavírus, os vírus são excretados nas fezes, durante vários dias, em concentrações muito elevadas ($>10^{12}$ partículas/grama).

Este facto, associado à ingestão mínima de 10 a 100 partículas ser suficiente para estabelecer a infeção de um novo hospedeiro e ainda à elevada resistência do vírus às condições ambientais, contribuem para a elevada incidência de GEA por rotavírus, tanto em países industrializados como em países de baixa renda. O vírus permanece infeccioso durante semanas em ambiente aquoso e resiste aos procedimentos normais de desinfeção.

Alimentos não cozinhados e águas não tratadas são fontes possíveis de surtos. A transmissão pessoa a pessoa ocorre diretamente por via fecal-oral e por via respiratória (aerossóis gerados por vômitos) ou indiretamente através de fômites, objetos inanimados capazes de adsorver, reter e transportar organismos contagiantes ou infecciosos (65, 66).

A ubiquidade da infecção por rotavírus e o facto de praticamente todas as crianças com 5 anos terem anticorpos contra estes vírus, levaram a considerar desde cedo a vacinação como a forma mais adequada de prevenção, sendo necessário avaliar a nível global a importância da diarreia por rotavírus. Em 2002, no sentido de obter estatísticas fiáveis, a OMS e o Centro de Controlo e Prevenção de Doenças dos EUA (CDC) estabeleceram um protocolo genérico para padronização dos estudos de vigilância da doença por rotavírus. Os critérios de inclusão são crianças com menos de 5 anos de idade, com episódios graves de diarreia aguda necessitando de hospitalização e com deteção de rotavírus por imunoensaio (51).

A vigilância tem decorrido em cerca de sessenta países, abrangendo as várias regiões da OMS. Cada uma destas regiões possui um escritório da OMS que recolhe todos os dados através do ministério da saúde e dos escritórios locais da OMS, divulgando posteriormente estes dados à comunidade global de saúde pública. Este modelo de vigilância conduziu a uma maior visibilidade da doença, uma validação dos dados e uma melhor sustentabilidade das plataformas de vigilância. Os resultados da vigilância global a partir do protocolo comum revelaram, para o ano de 2009, que a percentagem média de crianças hospitalizadas com diarreia grave e com resultado positivo para rotavírus era de 36%, um valor comparável ao obtido para os períodos de 2000-2004 (39%) e 2001-2008 (40%). Esta percentagem média variava entre 12% e 68% para os diferentes países (67).

Dois estudos de revisão sistemática e meta-análise estimaram a mortalidade associada aos rotavírus relativamente às mortes totais por diarreia, em crianças com menos de 5 anos, como sendo de 37% em 2008 (68) e 27,8% em 2011 (2). Apesar da proporção de rotavírus detetada em crianças hospitalizadas com diarreia ser maior nos países desenvolvidos, a maioria das mortes relacionadas com rotavírus ocorre em África e na Ásia (68).

A Índia representa um quinto do número de mortes, mas é na África Subsaariana que se regista maior concentração de países com taxas elevadas de mortalidade por rotavírus.

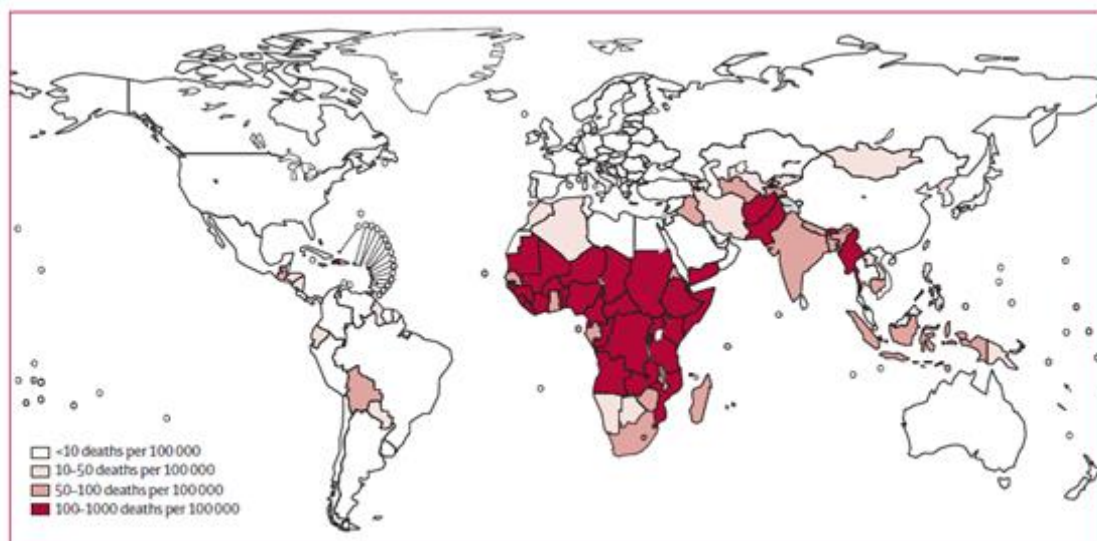


Figura 1.5. Número de mortes por rotavírus em crianças com idade < 5 anos, em 2008 (68).

1.4. Diversidade e Classificação dos Rotavírus

1.4.1. Grupos

O género *Rotavirus*, de acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), é subdividido em grupos (ou espécies) com base nas propriedades antigénicas ou na sequência de aminoácidos da proteína da cápside intermédia VP6. Até agora foram definidos 7 grupos (A-G), sendo que vírus de grupos diferentes não trocam segmentos entre si quando de uma coinfeção, contrariamente à possibilidade de redistribuição de segmentos observada entre vírus de um mesmo grupo. Os rotavírus dos grupos A, B e C foram identificados como agentes de diarreia aguda em humanos. O RVA é considerado o principal agente de diarreia em crianças, podendo infetar também outros mamíferos e aves. Os vírus do grupo B, associados a epidemias anuais de diarreia grave em adultos na China, Bangladesh, Índia e Myanmar, foram também identificados em suínos, bovinos, ovinos e roedores. Os surtos atribuídos ao grupo C têm sido descritos esporadicamente em crianças com idades entre 4 a 7 anos e associados a alimentos contaminados.

Os grupos D, F e G foram identificados, até agora, somente em aves e RVE apenas em suínos (7, 8, 9). Recentemente foi sugerido um novo grupo com base em dois vírus isolados de humanos e um de suíno (69).

1.4.2. Sistema de Classificação dos Rotavírus do Grupo A

A categorização das estirpes de RVA pode ser realizada com base nas propriedades antigénicas das proteínas estruturais da cápside VP6, VP7 e VP4 (subgrupos (SG), serotipos G e serotipos P, respetivamente) ou ainda com base na análise comparativa das respetivas sequências nucleotídicas (genogrupos e genótipos G e P[], respetivamente) (9).

- **Subgrupos e Genogrupos**

A especificidade antigénica da VP6 permite ainda diferenciar as estirpes de rotavírus do grupo A em quatro subgrupos (SG I, SG II, SG I+II e SG não-I e não-II) de acordo com a reatividade com os dois anticorpos monoclonais 255/60 e 631/99. Mais recentemente, com base na caracterização molecular, foram encontrados apenas dois grupos, o genogrupo I que corresponde a SGI e o genogrupo II que inclui os restantes subgrupos (70).

- **Serótipos e Genótipos**

Em 1989, foi estabelecido um sistema de classificação binário para os rotavírus baseado na reatividade imunológica das duas proteínas da cápside externa, VP4 e VP7, que independentemente induzem anticorpos neutralizantes. Assim, as estirpes de rotavírus são classificadas em serotipos de VP4 ou P (P para sensível a proteases) e serotipos de VP7 ou G (G para glicoproteína).

Uma vez que a caracterização baseada em serotipagem é demorada e requer reagentes específicos, *i.e.* soros hiperimunes e estirpes virais de referência, foi substituída por um sistema de classificação baseado na similaridade entre as sequências dos genes que codificam aquelas proteínas, dando origem à classificação em genótipos P e G (9, 16).

Os genótipos podem ser determinados através da amplificação por RT-PCR, sequenciação e análise das sequências nucleotídicas (totais ou parciais) obtidas para os respectivos genes ou através da geração de produtos de RT-PCR com tamanhos característicos, usando *primers* específicos para o genótipo, e análise do padrão eletroforético (78). Em relação à proteína VP7, uma vez que os resultados de serotipagem e genotipagem são concordantes, as estirpes são designadas apenas por Gx (x = número árabe começando em 1).

Para a proteína VP4, os resultados entre os dois métodos de tipagem nem sempre são coincidentes, havendo necessidade de uma dupla nomenclatura de tipagem P: os serótipos P são designados como Px (x = números árabe começando em 1) e os genótipos P como P[x]. Até agora foram identificados 35 genótipos P (VP4) e 27 genótipos G (VP7) diferentes (9). Entre estes genótipos, 12 G e 15 P estão associados a infecções humanas (10). Uma vez que os rotavírus possuem genoma segmentado, os genes de VP4 e VP7 podem, em teoria, segregar independentemente, havendo múltiplas combinações de genótipos G e P de rotavírus a circular na natureza. Globalmente, seis combinações G/P (G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8]) são responsáveis pela maioria das infecções por rotavírus em humanos, sendo G1P[8] a combinação mais prevalente (10). No entanto, são descritas frequentemente combinações G/P invulgares causadoras de doença, algumas resultantes da redistribuição de segmentos com rotavírus animais (71, 72).

1.4.3. Constelações de Genes

Uma limitação do sistema de classificação binário G/P é que ignora os restantes genes virais, não dando informação suficiente para avaliar toda a diversidade genética e relações evolutivas dos rotavírus circulantes. Tentou-se ultrapassar esta limitação através da sequenciação de genomas virais completos e da criação de um sistema de classificação baseado na informação genética dos genomas completos. Este sistema define um genótipo para cada um dos 11 segmentos do genoma, que codificam as VP e NSP, de acordo com valores *cut-off* de percentagem de identidade de sequências nucleotídicas.

A nomenclatura é idêntica à anteriormente seguida, sendo os segmentos genômicos para VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 representados pelo acrônimo Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx (x = números árabes), respetivamente (9). Foi igualmente criado o *Rotavírus Classification Working Group* (RCWG) que integra especialistas de várias áreas para ajudar à delineação de novos genótipos.

Análises baseadas na comparação de sequências de genomas completos de estirpes circulantes de RVA sugerem que a infeção de seres humanos em todo o mundo, durante longos períodos de tempo, se deve apenas a duas constelações de genótipos principais independentes dos genes G ou P: I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 e I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2, conhecidas como estirpes tipo Wa e tipo DS-1, respetivamente (73). A análise de genomas completos de rotavírus revelou uma origem comum para as estirpes humanas tipo Wa e de rotavírus de suínos e para as estirpes humanas tipo DS-1 e de rotavírus de bovinos (74).

1.4.4. Prevalência e Distribuição Geográfica de Genótipos

A distribuição geográfica e temporal das estirpes de rotavírus é um processo dinâmico e complexo. Um estudo recente de revisão sistemática sobre as variações regionais e temporais da prevalência das estirpes de rotavírus examinou dados desde 1996 até 2007, pertencentes a vários países das seis regiões geográficas da OMS (África, Américas, Sudoeste-Asiático, Europa, Mediterrâneo Oriental e Pacífico Ocidental) (11). Verificou-se que os genótipos G mais prevalentes eram G1 (42,9 %), G9 (14,1%), G2 (11,8%), G3 (11,1%), G4 (8,2%), G8 e G12 (1% cada), correspondendo a 90,2% de todas as estirpes avaliadas. As infeções com múltiplas estirpes e por rotavírus não tipáveis foram detetadas em 3,8% e 6,1% das amostras, respetivamente, sendo mais comuns em países de renda baixa. Nestes 12 anos, a frequência de G1 foi baixando, enquanto G3 reemergiu e G9 e G12 emergiram no mesmo período de tempo (11). Quando consideradas as publicações que incluíam a combinação de genótipos G/P, foram identificadas 5 estirpes comuns com uma prevalência a nível global de 74,7%; G1P[8] (37,7%), G9P[8] (11,4%), G2P[4] (10,6%), G3P[8] (8,8%) e G4P[8] (6,3%). As restantes correspondendo a infeções mistas (5,6%), estirpes não tipáveis (9,5%) e genótipos raros (10,2%).

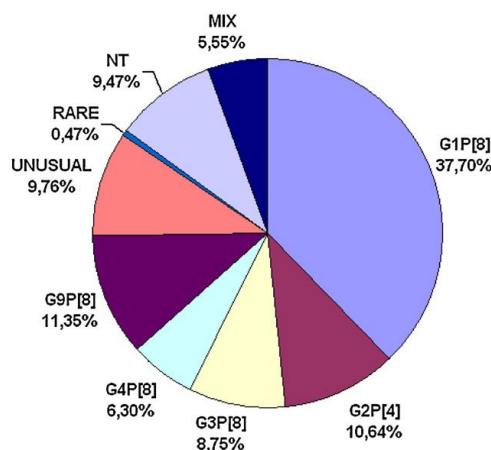


Figura 1.6. Prevalência das combinações de genótipos G/P a partir da revisão de dados, entre 1996 e 2007, provenientes de seis regiões da OMS (11)

No que respeita à distribuição geográfica, observaram-se grandes flutuações na prevalência de estirpes ao longo do tempo. Em África, de 2000 a 2007, verificou-se um aumento acentuado das estirpes G8 e ligeiro das G9 e G12, e um declínio das estirpes G3 e G4 (11). No continente Americano e na Europa observou-se igualmente um decréscimo das estirpes G1 paralelamente com um aumento de G9. O Sudeste Asiático possuía a incidência relativa mais elevada de G2, enquanto o Pacífico Ocidental tinha um decréscimo de estirpes G1 e concomitante aumento de G3.

Um estudo de vigilância da prevalência e genótipos de rotavírus realizado entre 2007 e 2011, sob o auspício da *African Rotavirus Surveillance Network*, envolvendo 16 países das várias regiões Africanas, demonstrou uma grande diversidade temporal e geográfica dos vírus circulantes (75). A distribuição de genótipos G revelou predominância de G1 (28,8%) seguido de G9 (17,3%), G2 (16,8%), G8 (8,2%), G12 (6,2%) e G3 (5,9%). Com exceção da região central, onde as estirpes G9 são mais abundantes, as estirpes G1 predominam nas diferentes regiões de África.

Relativamente aos genótipos P, P[8] é o mais prevalente (40,6%), seguido de P[6] (30,9%) e P[4] (13,9%). Globalmente, no continente Africano foram identificadas 25 combinações G/P, predominando G1P[8] (18,4%), G9P[8] (11,7%), G2P[4] (8,6%), G2P[6] (6,2%), G1P[6] (4,9%), G3P[6] (4,3%), G8P[6] (3,8%) e G12P[8] (3,1%).

Foi igualmente encontrado um número considerável de infecções mistas (17,5%) e de amostras parcialmente genotipadas (7,2%) (75).

No Sul de África circulam as combinações G9P[8] (20%), G1P[8] (14%), G1P[6] (6%), G12P[6] (6%), G8P[4] (5%) e G9P[6] (5%); na região Este G1P[8] (23%), G9P[8] (12%), G2P[4] (8%), G8P[6] (5%), G8P[4] (4%) e G9P[6] (4%). Na região Oeste são prevalentes G1P[8] (17%), G2P[6] (13%), G2P[4] (9%), G3P[6] (9%), G9P[8] (7%) e G1P[6] (5%). E na região Central, G2P[4] (17%), G2P[6] (14%), G9P[8] (11%), G1P[6] (9%), G1P[8] (6%) e G8P[6] (5%) (75). Curiosamente, tal como em estudos anteriores, estirpes tais como G2P[4], G3P[8] e G4P[8], que são de rotina encontradas em países industrializados são menos comuns em África. Pelo contrário, existe um grande número de estirpes, incluindo G1P[6], G2P[6], G3P[6], G1P[4], G9P[4], G12P[6] e G12P[8] de rotina encontradas em África (27–40% das estirpes circulantes anualmente) mas que são raras nos países desenvolvidos. Ainda, muitas das combinações identificadas são vulgarmente encontradas em animais, sugerindo transmissão direta animal-humano ou redistribuição de segmentos genómicos entre estirpes animais e humanas, provavelmente fruto da estreita proximidade entre animais domésticos e o Homem (76).

Atualmente desconhece-se qual a importância da diversidade genética para a eficácia das vacinas aprovadas contra rotavírus. De facto, a sua eficácia é menor nos países de baixa renda, nomeadamente Asiáticos e Africanos, em que se regista maior diversidade genética e onde circulam muitos genótipos não incluídos nas vacinas. Porém, os fatores correlacionados com a proteção conferida pela vacinação não estão totalmente esclarecidos, designadamente o papel da proteção homotípica e heterotípica, e várias outras causas têm sido igualmente apontadas para a redução da eficácia das vacinas naquelas regiões.

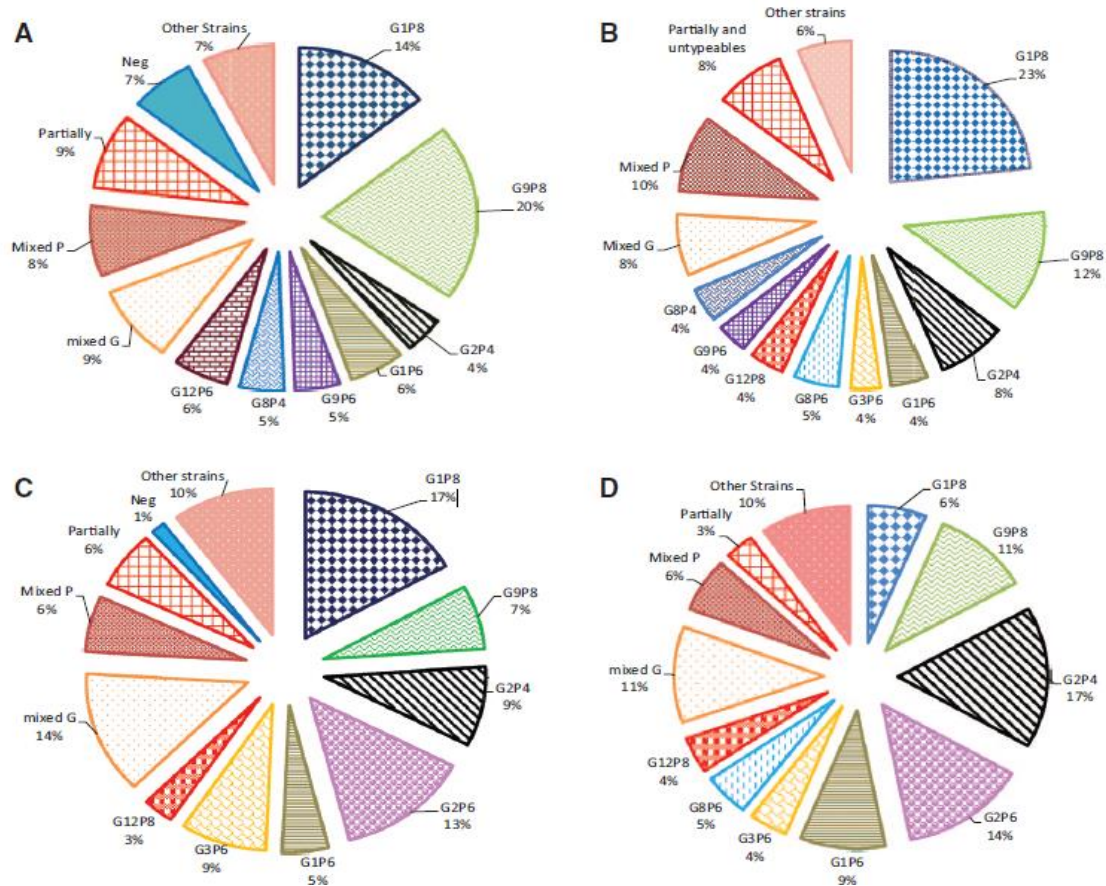


Figura 1.7. Combinações de genótipos circulantes em 4 regiões do continente Africano entre 2007 e 2011: A) Sul, B) Este, C) Oeste e D) Centro. (75)

1.5. OBJETIVOS DO TRABALHO

A nível mundial, em 2008, Angola era um dos dez países com maior número de mortes relacionadas com rotavírus em crianças com menos de 5 anos de idade (68). Neste contexto, em colaboração com o Ministério Nacional de Saúde e com a Direção Nacional de Saúde Pública de Angola iniciou-se um estudo piloto com objetivo principal de identificar agentes virais, designadamente rotavírus, presentes nas fezes de crianças com idade inferior a cinco anos com gastroenterite aguda, atendidas em vários hospitais e centros de saúde da região de Huambo.

Os objetivos específicos do estudo foram:

1. Determinar a prevalência da infeção por rotavírus na população acima mencionada, durante o mês de Junho de 2012;
2. Proceder à caracterização molecular das estirpes de rotavírus circulantes na população alvo e estimar a ocorrência dos diferentes genótipos.

MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. População do Estudo

Este estudo foi realizado em Angola, na província de Huambo (Figura 2.1), e teve como população alvo crianças de ambos os sexos, com idade inferior a cinco anos, com gastroenterite aguda (*i.e.* com diarreia, definida por três ou mais dejeções líquidas ou pastosas num período de 24 horas, e/ou vômitos). Estas crianças (a cumprir os critérios de inclusão mencionados anteriormente) foram atendidas em consultas externas, de urgência, em Hospitais ou Centros de Saúde da sua área de residência.

As amostras de fezes foram colhidas em Junho de 2012, durante o período de época seca, “cacimbo”, que em Angola se estende de Maio a Agosto.

A recolha envolveu seis instituições de prestação de cuidados de saúde situadas em quatro municípios da Província de Huambo, designadamente Bailundo, Cáala, Huambo e Londuimbali. No município do Huambo os postos de colheita foram o Centro de Saúde Materno-Infantil da freguesia de Mineira e o Centro de Saúde do Casseque III; no município de Cáala a colheita efetuou-se no Hospital Municipal de Caála e no Centro de Saúde de Calenga; na cidade de Bailundo o procedimento realizou-se no Hospital Municipal de Bailundo; e no município de Londuimbali a recolha foi efetuada no Hospital Municipal de Alto-Hama (Figura 2.2).



Figura 2.1. Mapa de África e de Angola com as respetivas Províncias. Adaptado de (21).

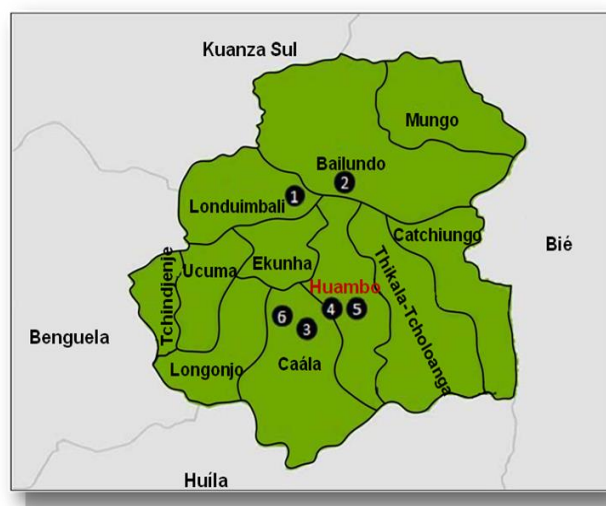


Figura 2.2. Mapa da Província de Huambo e dos respetivos Municípios. Assinaladas de 1 a 6 estão as instituições de saúde inseridas no estudo. 1- Hospital de Alto Hama, 2- Hospital de Bailundo, 3- Hospital de Caála, 4- Centro de Saúde de Casseque III, 5 - Centro Materno Infantil de Mineira e 6- Centro de Saúde de Calenga. Adaptado a partir de (22).

2.2. Avaliação Clínica e Recolha de Dados

A avaliação e a triagem clínica das crianças foram realizadas pelo médico assistente em consulta externa ou de urgência de acordo com a definição de cada caso clínico. O Profissional de Saúde foi responsável por verificar se a criança se enquadrava na população alvo do estudo e explicar os objetivos do mesmo ao responsável legal/acompanhante da criança, de forma a posteriormente pedir a colaboração e autorização para a recolha de uma amostra de fezes e utilização dos dados clínicos da criança, através de um formulário de consentimento informado (Anexo 6.1). A recolha de dados efetuou-se através de um questionário (Anexo 6.2), preenchido pelo enfermeiro responsável em colaboração com o familiar da criança e pelo técnico de laboratório que realizou o teste rápido de identificação do agente estudado. O questionário é constituído por questões fechadas e dividido em três secções como dados demográficos, história clínica e resultados da análise laboratorial das amostras fecais. O questionário e o formulário de consentimento informado foram aprovados pelas Comissões de Ética do Instituto de Higiene e Medicina Tropical e de Angola.

2.3. Colheita e Armazenamento de Amostras Biológicas

A colheita de amostra de fezes foi realizada pelo enfermeiro, para um recipiente estéril devidamente identificado de acordo com procedimentos pré-definidos. As amostras foram mantidas de forma refrigerada (2°C - 4°C) até ser efetuado o teste rápido de identificação de antígenos virais, subsequentemente foram guardadas a -20°C e transportadas de forma refrigerada para o Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) em Lisboa, onde foram preservadas a -20°C até serem analisadas por métodos moleculares.

2.4. Detecção de Antígenos Virais

A detecção de antígenos de rotavírus, em amostras de fezes, foi realizada através de testes rápidos imunocromatográficos qualitativos (Figura 2.3).

Foram utilizadas duas marcas diferentes de *kit* de ensaios, tendo em Angola sido utilizado o teste rápido *SD Bioline Rota/Adeno®*, (*Standard Diagnostics Inc.*, Coreia do Sul), para detecção de RVA. Em Portugal, no IHMT, utilizou-se o teste rápido *CerTest Rotavirus-Adenovirus* (*CerTest*, Espanha), para realizar testes de confirmação dos resultados negativos e inválidos de acordo com o primeiro teste rápido efetuado em Angola.

Os ensaios foram realizados segundo as indicações dos respetivos fabricantes, utilizando-se cerca de 100 mg de cada amostra, recolhidas com o auxílio de uma ansa ou de uma pipeta de Pasteur, aquando de uma amostra líquida.

Os testes usam anticorpos monoclonais contra rotavírus, imobilizados numa zona definida da membrana de nitrocelulose, para captura de antígenos de rotavírus (VP6 da cápside) presentes na amostra de fezes. Estes, quando da aplicação da amostra, reagem com anticorpos contra rotavírus conjugados com um corante presente no ponto de aplicação. Os complexos antígeno-anticorpo corados migram por capilaridade até à zona dos anticorpos de captura que, ao concentrarem aqueles complexos, dão origem à formação de uma linha corada (84).



Figura 2.3. Kit de teste rápido para a detecção de antígenos de rotavírus (23).

2.5. Genotipagem de Rotavírus

A identificação dos genótipos de rotavírus decorreu de acordo com o algoritmo esquematizado na Figura 2.4. Resumidamente, no caso das amostras positivas para rotavírus por teste rápido procedeu-se à extração de RNA, síntese de Ácido Desoxirribonucleico complementar (cDNA) a partir do RNA extraído (transcrição reversa), amplificação por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) de sequências dos genes para VP4 e VP7 (genótipos P e G, respetivamente) usando *primers* genéricos numa primeira reação, seguido de *primers* específicos de genótipo numa segunda reação (*hemi-nested PCR*) e análise dos produtos de amplificação. Ainda, para confirmação dos resultados de genotipagem obtidos por este método e para genotipagem de estirpes não tipáveis (ausência de bandas na segunda reação ou presença de múltiplas bandas) procedeu-se à sequenciação do produto da primeira reação e análise das sequências obtidas. O cDNA das amostras que deram origem a testes rápidos positivos mas que não geraram produtos na primeira reação de PCR foi usado para amplificação de sequências do gene da proteína VP6.

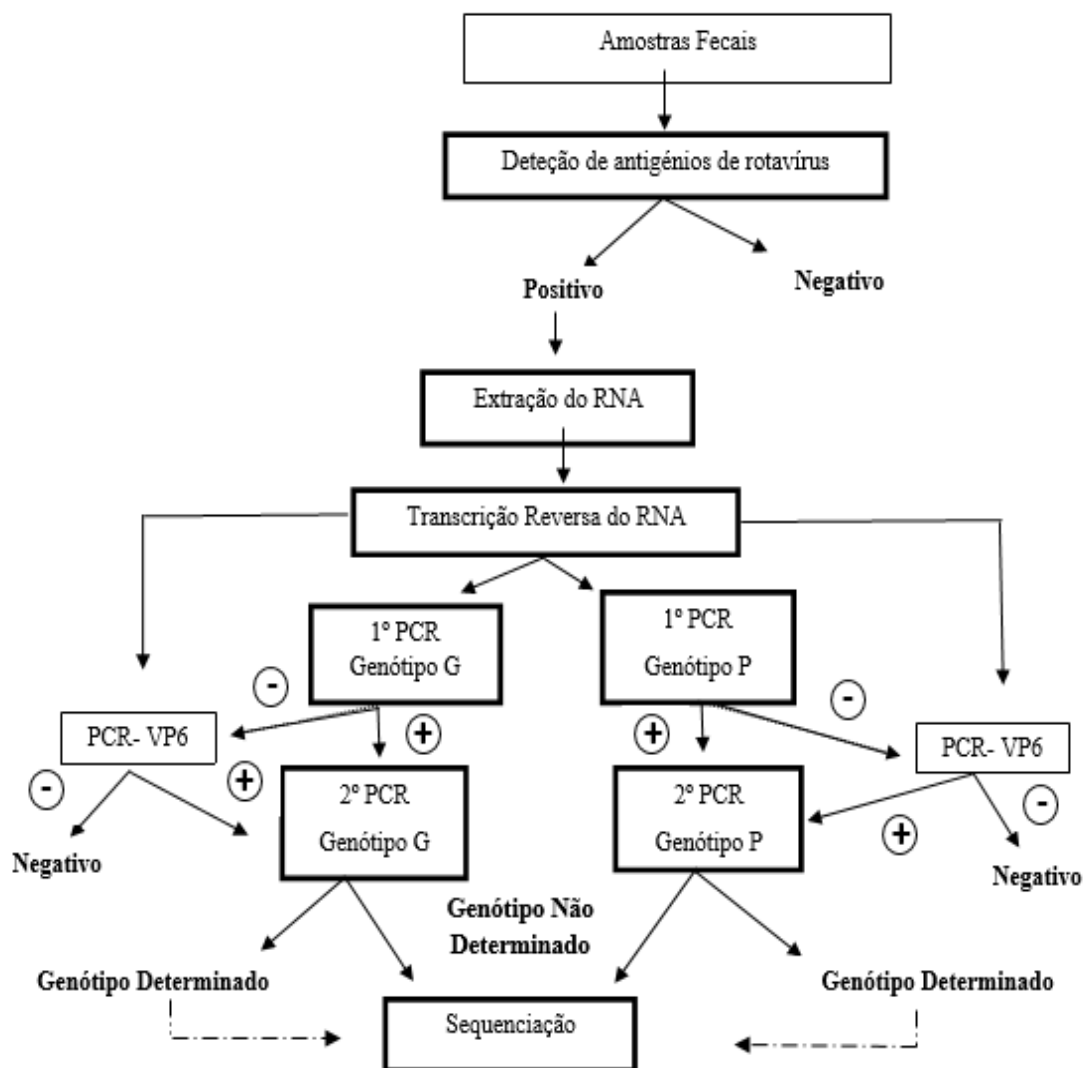


Figura 2.4. Fluxograma do procedimento usado na genotipagem de rotavírus. (+) Amplificação Positiva e (-) Amplificação Negativa, resultado das *PCR*'s. As setas a tracejado representam algumas amostras enviadas para sequenciação de forma a serem confirmados os genótipos determinados por *hemi-nested multiplex PCR*.

2.6. Extração de RNA

O RNA viral foi extraído a partir de uma suspensão de aproximadamente 10% de fezes (100µl de amostra líquida ou uma porção do tamanho de uma ervilha de uma amostra sólida) em 1 mililitro (ml) de meio de cultura *Minimum Essential Medium* (Gibco Life Technologies, Reino Unido).

Na extração de RNA usou-se o *kit INSTANT Virus RNA* (BIOMETRA, Analytik Jena, Alemanha) seguindo o protocolo indicado para isolamento de RNA viral a partir de fluidos do corpo sem células. Iniciou-se o protocolo com a adição de 450 µl de solução de lise, com tiocianato de guanidina, a tubos de extração devidamente identificados contendo 150 µl de amostra. De seguida, os conteúdos dos tubos foram homogeneizados e mantidos 15 minutos à temperatura ambiente, período durante o qual foram submetidos quatro vezes a agitação com vortex. Nesta etapa, existe disrupção dos viriões presentes na amostra, com proteção do RNA viral da degradação pelas ribonucleases (RNases). Os tubos foram rapidamente centrifugados e adicionada solução de ligação RBS que proporciona as condições necessárias para a ligação do RNA às colunas. Após mistura com vórtex, as amostras foram transferidas, por duas vezes, para colunas (*spin filters*) adaptadas a tubos coletores devidamente identificados, seguindo-se a cada transferência uma centrifugação a 10 000 força g (x g), 1 minuto. A remoção de contaminantes ligados inespecificamente à coluna foi realizada através da lavagem das colunas, por adição de soluções de lavagem com etanol. Este processo foi realizado em duas fases, a primeira com adição de 500 µl de uma solução com elevada concentração de sal (solução HS) e a seguir com adição de 650 µl de uma solução com baixa concentração de sal (solução LS), seguindo-se uma centrifugação a 10 000x g, 1 minuto. Para a remoção total do etanol os tubos foram submetidos a uma centrifugação de 16 000x g, 2 minutos. Por fim, as colunas são transferidas para tubos de eluição, devidamente identificados, sendo a eluição efetuada com 60 µl de água sem RNases. Os tubos permaneceram durante 2 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente foram centrifugados a 5000x g, 1 minuto. Este processo reduz a presença de inibidores das enzimas da Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase - (RT-PCR) e inativa irreversivelmente as RNases provenientes das amostras de fezes (51).

O RNA eluído em 60 µl, foi distribuído por dois microtubos livres de RNases e Desoxirribonucleases (DNases), em alíquotas de 27 µl e 33 µl de seguida armazenadas, respetivamente, a -20 graus Celsius (°C) para serem utilizadas a curto prazo ou a -80°C para uma conservação prolongada.

2.7. Transcrição Reversa

A síntese de cDNA a partir do dsRNA viral, que servirá de matriz (*template*) na amplificação subsequente por PCR, foi realizada com o *kit RevertAid Premium First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EUA), este possui uma enzima Transcriptase Reversa (RT) (200U/µl), um Tampão de reação RT (5x), uma mistura de trifosfatos de desoxirribonucleotídeos (dNTPs) (10 milimolar (mM)) e hexâmeros aleatórios (0,2 microgramas (µg)/ µl). A preparação da enzima inclui um inibidor de RNases que protege o RNA da degradação.

O processo inicia-se com a adição a cada alíquota de 27 µl de dsRNA, extraído anteriormente, de 2 µl da solução de hexâmeros aleatórios, seguindo-se a desnaturação dos ácidos nucleicos a 97°C durante 5 minutos e arrefecimento em gelo durante, no mínimo, 2 minutos. A síntese de cDNA é efetuada com a adição de uma mistura de 2 µl da solução de dNTPs, 8 µl de tampão de RT e 2 µl da enzima RT. A reação foi iniciada com emparelhamento dos hexâmeros a 25°C, 10 minutos, seguido do passo de transcrição reversa a 50°C, 30 minutos, e inativação da enzima a 85°C, 5 minutos, usando o termociclador *iCycler* (Bio-Rad, EUA). O cDNA transcrito foi posteriormente armazenado a -20°C ou a -80°C.

2.8. Preparação de *primers*

Os *primers*, oligonucleótidos sintéticos iniciadores, utilizados para a amplificação das regiões codificantes das proteínas VP4, VP7 e VP6 de rotavírus, a partir do RNA viral, por RT-PCR, estão descritos nas tabelas 2.1, 2.2 e 2.3, respetivamente. Nestas tabelas são indicadas as sequências oligonucleotídicas, a sua localização no genoma viral e tamanho esperado do amplicão. Alguns *primers* utilizados neste estudo, VP6-F, VP6-R, G9, G10, VP4-F, 1T-1D (P[8]), apresentam degenerações (Y=T/C, R=G/A, N=A/T/C/G).

Todos os *primers* foram sintetizados e purificados pela empresa *STABvida* (Caparica, Portugal). A sua preparação, a partir do produto liofilizado, foi realizada em câmara de fluxo laminar. Cada um dos *primers* foi hidratado com água (H₂O) sem nucleases, para uma concentração final de 200 picomoles (pmol)/μl. Posteriormente, as soluções *stock* dos *primers* foram diluídas para soluções de trabalho a 20 pmol/μl, sendo mantidas a -20°C.

2.9. Hemi-Nested Multiplex PCR

A genotipagem realizou-se por *hemi-nested multiplex PCR* a partir do cDNA transcrito anteriormente (51). Este protocolo inclui a realização de duas reações de PCR sequenciais em que o produto da primeira reação é usado como molde na segunda (*nested*). De forma que os rotavírus fossem classificados duplamente em relação aos genótipos G e P, foi necessário amplificar em separado as sequências nucleotídicas que codificam para as proteínas VP7 e VP4. Esta duplicação deve-se ao facto dos genes codificantes destas proteínas estarem em segmentos genómicos diferentes sendo segregados de forma independente.

Na primeira PCR utiliza-se um par de *primers* externos específicos, designados de *forward* (F) e *reverse* (R), para amplificar uma sequência parcial do gene de VP4, nucleótidos 132-795, ou uma sequência parcial do gene de VP7, nucleótidos 51-932. Estes *primers* estão descritos nas Tabelas 2.1 e 2.2.

Na segunda amplificação é utilizado o produto da 1ª PCR, a que se junta um *primer* externo da reação anterior (F ou R, respetivamente para VP4 e VP7), consoante a sequência genética a amplificar, e uma mistura de *primers* internos específicos de genótipos individuais, que amplificam sequências de tamanho distinto e bem definido, correspondentes aos principais genótipos G ou P circulantes. Estes *primers* internos possuem polaridade oposta ao *primer* externo utilizado (Figura 2.5).

Para a realização da reação foi utilizado o *kit DreamTaq DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EUA), contendo a enzima *DreamTaq DNA Polymerase* (5U/μl), Tampão *DreamTaq* (10x), dNTPs (10mM), MgCl₂ (20mM) e H₂O livre de nucleases. Tendo sido utilizada a mesma metodologia para a amplificação das diferentes sequências, que permitem a identificação dos genótipos.

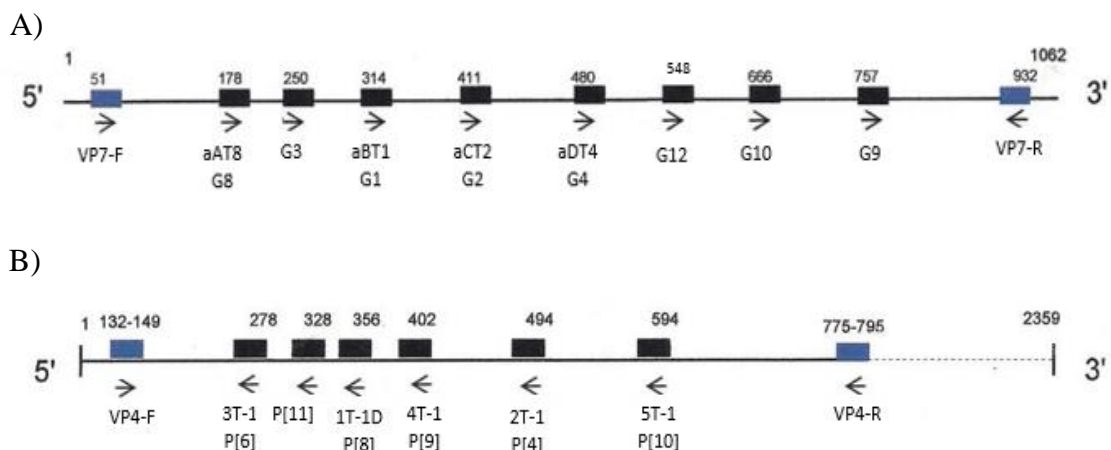


Figura 2.5. Diagrama das posições dos *primers* nas sequências codificantes de A) VP7 e B) VP4, específicas para cada genótipo.

2.9.1. Amplificação por PCR

Na primeira PCR adicionou-se 2,5 µl de cDNA a uma mistura contendo 18,4 µl H₂O sem nucleases, 2,5µl de Tampão Taq (10x), 0,5µl de dNTPs (10mM), 0,5 µl dos *primers* externos respetivos à sequência (VP4-F/VP4-R ou VP7-F/VP7-R) (20 pmol/µl) e 0,125 µl de Dream Taq Polimerase (5U/µl). A mistura de reação (volume total de 25 µl) foi homogeneizada com vortex, centrifugada brevemente e transferida para o termociclador iCycler (*Bio-Rad*, EUA).

As condições de amplificação consistiram num ciclo de desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificação compostos por desnaturação a 94°C 1 minuto, hibridação dos oligonucleótidos 1 minuto a 50°C (ou 52°C no caso da reação de amplificação da sequência parcial de VP7) e extensão 1 minuto a 72°C. No final realizou-se mais um ciclo de extensão durante 7 minutos.

Os produtos amplificados resultantes das sequências parciais de VP4 e VP7 deverão possuir um tamanho de 663 pb e 881pb, respetivamente. A análise destes foi efetuada através eletroforese em gel de agarose.

Na segunda PCR o volume final da reação foi de 25 µl, sendo transferidos 1,0 µl e 2,5 µl do produto da 1ª de PCR das sequências de VP4 e VP7, respetivamente, para a nova mistura de reação. A mistura de reação da 2ª PCR difere da primeira essencialmente no que respeita aos *primers* usados.

Para a genotipagem do gene de VP4 adiciona-se 0,5 µl do *primer* externo VP4-F e 0,5 µl de cada um dos primers P[4], P[6], P[9], P[10], P[11] e 1,0 µl de P[8]. Na genotipagem do gene de VP7 adiciona-se 0,5 µl do *primer* externo VP7-R e 0,5 µl de cada G1, G2, G3, G4, G8, G9, G10 e G12.

As condições de amplificação consistiram numa desnaturação de 4 minutos a 94°C, 30 ciclos de amplificação consistindo em 94°C 1 minuto, 45°C 2 minutos (ou a 42°C no caso da reação de amplificação da sequência parcial de VP7) e 72°C 1 minuto. No final realizou-se um ciclo de extensão 7 minutos a 72°C.

Os genótipos P e G forem identificados através do padrão eletroforético em gel de agarose formado pelos diferentes fragmentos nucleotídicos amplificados descritos nas Tabelas 2.1 e 2.2.

Tabela 2.1. Primers utilizados para a 1ª e 2ª reações de amplificação da região codificante da proteína VP4

	<i>Primers</i>	Sequência	Tamanho do produto	Localização no fragmento genómico
<i>Primers</i> Externos ^σ	VP4-F	5'TATGCTCCAGTNAATTGG 3'	663pb	nt 132-149
	VP4-R	5'ATTGCATTTCTTCCATAATG 3'		nt 775-795
<i>Primers</i> Internos [#]	2T-1 (P[4])	5'CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC 3'	362pb	nt 474-494
	3T-1 (P[6])	5'TGTTGATTAGTTGGATTCAA 3'	146pb	nt 259-278
	1T-1D (P[8])	5'TCTACTGGRTTRACNTGC 3'	224pb	nt 339-356
	4T-1 (P[9])	5'TGAGACATGCAATTGGAC 3'	270pb	nt 385-402
	5T-1 (P[10])	5'ATCATAGTTAGTAGTCGG 3'	462pb	nt 575-594
	P[11]	5'GTAAACATCCAGAATGTG 3'	191pb	nt 305-328

^σ Simmonds MK et al., 2008 (85); [#] Iturriza Gómara et al., Clinical 2004 (86). nt = nucleótidos e pb = pares de bases.

Tabela 2.2. Primers utilizados para a 1ª e 2ª reações de amplificação da região codificante da proteína VP7

	<i>Primers</i>	Sequência	Tamanh o do produto	Localização no fragmento genômico
<i>Primers Externos[#]</i>	VP7-F	5' ATG TAT GGT ATT GAA TAT ACC AC 3'	881pb	nt 51-71
	VP7-R	5' AAC TTG CCA CCA TTT TTT CC 3'		nt 914-932
<i>Primers Internos[*]</i>	aBT1 (G1)	5'CAA GTA CTC AAA TCA ATG ATG G 3'	618pb	nt 314-335
	aCT2 (G2)	5'CAA TGA TAT TAA CAC ATT TTC TGT G 3'	521pb	nt 411-435
	G3	5' ACG AAC TCA ACA CGA GAG G 3'	682pb	nt 250-269
	aDT4 (G4)	5'CGT TTC TGG TGA GGA GTT G 3'	452pb	nt 480-499
	aAT8 (G8)	5'GTC ACA CCA TTT GTA AAT TCG 3'	754pb	nt 178-198
	G9	5'CTT GAT GTG ACT AYA AAT AC 3'	179pb	nt 757-776
	G10	5' ATG TCA GAC TAC ARA TAC TGG 3'	266pb	nt 666-687
	G12	5'CCG ATG GAC GTA ACG TTG TA 3'	387pb	nt 548-567

[#] Iturriza Gómara et al., 2004 (86); ^{*} Bamerjee I. et al., 2007 (87) nt = nucleótidos e pb = pares de bases.

2.10. Amplificação por PCR da Sequência Nucleotídica Parcial de VP6

A reação de PCR, realizada para detetar a presença de ácidos nucleicos de rotavírus, baseia-se na amplificação de um fragmento de cDNA de 379 pb, usando como matriz uma sequência nucleotídica do gene 6 (nucleótidos 747-1125), que codifica parte da proteína VP6 da cápside dos rotavírus do grupo A (Tabela 2.3).

A mistura de reação (volume total 25 µl) com concentrações de tampão, dNTPs e polimerase Taq idênticas às anteriormente descritas, contém 0,5 µl de cada um dos *primers* VP6-F e VP6-R (20pmoles/µl), e 2,5 µl de cDNA. A reação processa-se com uma desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de amplificação consistindo nos passos de 94°C, 1 minuto; 55°C, 1 minuto; 72°C, 1 minuto. No final realiza-se mais um ciclo de extensão 7 minutos a 72°C. A análise do produto amplificado foi feita por eletroforese em gel de agarose, esperando-se uma banda de 379 pb.

Tabela 2.3. Primers utilizados para a amplificação da região codificante da proteína VP6

	Primers	Sequência	Tamanho do produto	Localização no genoma
Primers Específicos ^β	VP6-F	5`GACGGVGCRACTACATGGT 3`	379 pb	nt 747-766
	VP6-R	5`GTCCAATTCATNCCTGGT G 3`		nt 1106-1126

^β Iturriza Gómara et al., 2002 (70). nt = nucleótidos e pb = pares de bases.

2.11. Eletroforese em Gel de Agarose

A análise dos produtos obtidos por PCR e *hemi-nested multiplex* PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose, correndo paralelamente marcadores de tamanhos moleculares (*GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder*, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EUA), seguida da observação do gel sob luz ultravioleta.

Foram utilizados géis de agarose (SIGMA, Missouri, EUA) a 2% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE 0,5X) (0,02 M Tris-Acetato, 0,5 mM Etilenodiaminatetracetato (EDTA) (pH 8,0) contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml).

Em cada poço aplicou-se 8 µl do produto de PCR misturados com 3 µl de tampão de aplicação (0,25% (p/v) de azul de bromofenol, 40% (p/v) sacarose). Usando TAE (0,5x) como eletrólito, a eletroforese decorreu a uma voltagem constante de cerca de 80 volts, 3 a 4 horas. No final procedeu-se à observação do gel sob luz ultravioleta, e à captura de imagem com o equipamento *Gel-Doc XR* da *Bio-Rad* (Califórnia, EUA).

2.12. Sequenciação de Produtos de PCR e Análise das Sequências

A purificação e sequenciação do DNA amplificado na primeira reação de PCR foi realizada pela empresa *STABvida* (Caparica, Portugal). Na sequenciação dos fragmentos dos genes que codificam para VP4 e VP7 usaram-se os *primers* VP4-F e VP7-R, respetivamente. O método usado baseou-se na técnica de terminação de cadeias com didesoxirribonucleótidos, descrito originalmente por Sanger *et al.*, 1977, incluído num protocolo de sequenciação automática. Os cromatogramas correspondentes às diferentes reações de sequenciação foram analisados e as sequências nucleotídicas correspondentes corrigidas manualmente através do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (www.mbio.ncsu.edu/biEdit/bioedit.html).

Recorrendo ao programa *Nucleotide Basic Local Alignment and Search Tool (BLAST)* (site: www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), as sequências editadas resultantes foram sujeitas a uma pesquisa de homologia com sequências depositadas na base de dados do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* e determinado o genótipo viral mais provável das sequências de rotavírus em estudo através da percentagem de semelhança com as sequências das bases de dados de genótipos conhecidos.

Para confirmar os resultados de genotipagem obtidos por pesquisa de homologias e aferição de relações filogenéticas entre as sequências nucleotídicas dos rotavírus estudados com as sequências de rotavírus de bases de dados internacionais, foram construídas árvores filogenéticas para os genes VP4 e VP7. Para tal, as sequências nucleotídicas obtidas foram alinhadas com sequências de referência para os diferentes genótipos de RVA e com sequências de rotavírus circulantes em países vizinhos, disponíveis na base de dados GenBank usando o programa *ClustalW* a partir do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*. O alinhamento múltiplo editado foi usado na construção de árvores filogenéticas produzidas e visualizadas através do *software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA)*, versão 5.0 (79), usando o método de *Neighbor-Joining*, (NEIGHBOR, Phylip Package v.3.68) e o modelo de 2 parâmetros de Kimura. A robustez da inferência filogenética decorreu da análise de *bootstrap* de 1000 replicados.

2.13. Análise Estatística

Os dados epidemiológicos foram analisados com recurso ao programa SPSS, versão 21.0 (SPSS, Chicago, USA). A análise e comparação das variáveis foi efetuada com recurso aos testes Qui-quadrado, T-test e o teste exato de Fisher tendo sido considerado o limite de significância estatística de 5% ($p < 0,05$).

O cálculo da escala de gravidade dos episódios de diarreia teve por base o sistema de pontuação de 20 pontos como descrito em Nakagomi *et al.* (41). A pontuação foi atribuída segundo a duração da diarreia, em dias: $< 2 = 1$ ponto, $2-4 = 2$ pontos, $> 4 = 3$ pontos; número de episódios de diarreia, em 24h: $3 = 1$ ponto, $4-5 = 2$ pontos, $> 5 = 3$ pontos; duração dos vômitos, em dias: $1-2 = 2$ pontos, $\geq 3 = 3$ pontos; número de episódios, em 24h: $1 = 1$ ponto, $2 = 2$ pontos, $\geq 3 = 3$ pontos; desidratação: ausência = 0 pontos, clinicamente significativo = 2 pontos; febre: $< 37,6^\circ\text{C} = 0$ pontos,

37,6 °C-38,6 °C = 2 pontos, > 38,6 °C = 3 pontos; nível de atividade: normal = 0 pontos, reduzida = 3 pontos. Os indicadores de malnutrição foram calculados com o auxílio do programa *WHO Anthro*, disponibilizado no *site* da OMS, com base nas características antropométricas, como a idade, o peso e a altura das crianças inquiridas.

Tendo sido avaliado o estado de subnutrição através do peso em relação à idade, o estado de malnutrição crónica pela altura em relação à idade e o estado de malnutrição aguda de acordo com o peso em relação à altura. Segundo os critérios da OMS, as crianças são consideradas malnutridas se o valor de *Z-scores* < -2 desvio padrão (*standard deviations* - SD) em relação aos valores considerados normais, e gravemente malnutridas se o valor de *Z-scores* < -3 desvio padrão em relação ao normal.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização Demográfica e Clínica da População Estudada

No estudo da infeção por rotavírus na região de Huambo foram incluídas e inquiridas 246 crianças com sintomas característicos de gastroenterite aguda de 6 instituições de saúde (Tabela 3.1). A todas as crianças que participaram no estudo foi realizado um inquérito demográfico e clínico (Anexo 6.2). No entanto, dos 246 inquéritos realizados só se conseguiu ter acesso a 95, correspondendo a 38,6% da amostragem.

Tabela 3.1. Distribuição das crianças inquiridas por instituição de saúde na região do Huambo, Angola (2012).

Instituição de Saúde	Número de Crianças (nº inquéritos disponíveis)
Hospital Municipal de Alto-Hama	26 (12)
Hospital Municipal de Bailundo	43 (18)
Hospital Municipal de Caála	100 (34)
Centro de Saúde de Casseque III	11 (11)
Centro de Saúde Materno Infantil de Mineira	57 (11)
Centro de Saúde de Calenga	9 (9)
Total	246 (95)

Em termos demográficos, 62,1% (59/95) das crianças vivia em áreas rurais e 37,9% (36/95) morava no meio urbano. A percentagem de rapazes inquiridos foi superior à de raparigas (60% e 40%, respetivamente). A idade média da amostragem é de 9 meses, variando entre 1 mês e 27 meses, sendo que a maior prevalência de gastroenterite foi observada em crianças na faixa etária dos 7-12 meses (47,4%) e somente 18,9% possuía mais de 12 meses (Tabela 3.2). Em relação à alimentação, verificou-se que 88,1% das crianças eram alimentadas por amamentação conjuntamente com outro tipo de alimentos, sendo que a percentagem de crianças exclusivamente amamentadas era de 11,9% e apenas 5,3% não estava a ser amamentada (Tabela 3.3).

Tabela 3.2. Características demográficas da população alvo e relação com a infeção por rotavírus no Huambo, Angola (2012).

Variáveis	Categorias	Nº de Crianças (n= 95), n (%)	Rotavírus + (n= 49), n (%)	Rotavírus – (n=46), n (%)	Valor_p ^{a)}
Género	Masculino	57 (60,0)	29 (50,9)	28 (49,1)	0,867
	Feminino	38 (40,0)	20 (52,6)	18 (47,4)	
Idade (meses)	0-6	32 (33,7)	19 (59,4)	13 (40,6)	0,560
	7-12	45 (47,4)	23 (51,1)	22 (48,9)	
	13-24	16 (16,8)	6 (37,5)	10 (62,5)	
	>24	2 (2,1)	1 (50,0)	1 (50,0)	
Local de residência	Urbano	36 (37,9)	14 (38,9)	22 (61,1)	0,053
	Rural	59 (62,1)	35 (59,3)	24 (40,7)	

^{a)} Foi utilizado o teste estatístico do Qui-quadrado para o cruzamento de dados e para determinar o valor significância dos mesmos.

Tabela 3.3. Características da alimentação da população alvo e relação com a infeção por rotavírus no Huambo, Angola (2012).

Variáveis	Categorias	Nº de Crianças n (%)	Rotavírus + n (%)	Rotavírus – n (%)	Valor_p ^{a)}
A criança está a ser amamentada? (n= 94) ^{b)}	Sim	89 (94,7)	46 (51,7)	43 (48,3)	0,674
	Não	5 (5,3)	2 (40,0)	3 (60,0)	
Se SIM, durante a amamentação comeu outros alimentos? (n= 84) ^{c)}	Amamentação + Outros Alimentos	74 (88,1)	37 (50,0)	37 (50,0)	0,739
	Amamentação Exclusiva	10 (11,9)	4 (40,0)	6 (60,0)	

^{a)} Foi utilizado o teste estatístico exato de Fisher para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

^{b)} Para uma criança não se esclareceu se estava a ser a amamentada.

^{c)} Em 5 crianças não se esclareceu se estavam a ser exclusivamente amamentadas ou se ingeriam outros alimentos.

As crianças apresentavam um quadro clínico considerável, sendo que 94,7% tinha diarreia, com duração e frequência médias de 3,9 dias e 3,7 episódios em 24h, respetivamente, e 81,5% tinha vômitos com duração e frequência médias de 2,8 dias e 2,8 episódios por dia, respetivamente (Tabelas 3.4 e 3.5). Uma percentagem significativa das crianças (75,0%) manifestou diarreia e vômitos. No entanto, só 9,9% das mesmas apresentou uma temperatura axial igual ou superior a 37,6 °C (Tabela 3.4). Relativamente ao estado de desidratação das 85 crianças avaliadas, observou-se que 43,5% não apresentava qualquer característica de desidratação, em 30,1% identificou-se uma desidratação ligeira, em 25,3% moderada e em 2,4% um índice de desidratação grave (Tabela 3.4). O estado de atividade das crianças também foi analisado como “Normal” ou “Reduzido”, tendo sido considerado “Normal” em 63,1% e como “Reduzido” em 36,9% dos casos (Tabela 3.4).

Tabela 3.4. Características clínicas da população com gastroenterite aguda e relação com a infeção por rotavírus no Huambo, Angola (2012).

Características Clínicas		Nº Crianças n (%)	Rotavírus + (n= 49), n (%)	Rotavírus – (n=46) n (%)	Valor <i>p</i>
Temperatura Axial (n= 81)	< 37,6°C	73 (90,0)	39 (79,6)	34 (73,9)	0,290 ^{a)}
	≥ 37,6°C	8 (9,9)	6 (12,2)	2 (4,3)	
Diarreia (n= 95)	Sim	90 (94,7)	44 (89,8)	46 (100,0)	0,057 ^{a)}
	Não	5 (5,3)	5 (10,2)	0 (0,0)	
Vômitos (n= 92)	Sim	75 (81,5)	44 (89,8)	31 (67,4)	0,002 ^{b)}
	Não	17 (18,5)	3 (6,1)	14 (30,4)	
Desidratação (n=85)	Sim	48 (56,5)	27 (55,1)	21 (45,7)	0,234 ^{b)}
	Não	37 (43,5)	16 (32,7)	21 (45,7)	
Atividade (n=84)	Normal	53 (63,1)	22 (44,9)	31 (67,4)	0,143 ^{b)}
	Reduzida	31 (36,9)	18 (36,7)	13 (28,3)	

^{a)} Foi utilizado o teste estatístico exato de Fisher para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

^{b)} Foi utilizado o teste estatístico do Qui-quadrado para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

Tabela 3.5. Duração e frequência médias das características clínicas da população alvo e relação com a infeção por rotavírus no Huambo, Angola (2012).

Características Clínicas	Média por N° Crianças	Rotavírus +	Rotavírus –	Valor_p ^{a)}
Temperatura Axial $\geq 37^{\circ}\text{C}$				
Duração média (dias)	2,3	2,6	2,1	0,281
Diarreia				
Duração média (dias)	3,9	4,2	3,6	0,305
N° de vezes/ 24h (média)	3,7	3,7	3,6	0,677
Vómitos				
Duração média (dias)	2,8	2,8	2,7	0,647
N° de vezes/ 24h (média)	2,8	3,1	2,4	0,042

a) Foi utilizado o teste estatístico T-Student para comparar valores médios e para determinar o valor de significância dos mesmos.

Tabela 3.6. Pontuação média da gravidade dos sintomas clínicos na população alvo em relação à idade e à infeção por rotavírus no Huambo, Angola (2012).

Variáveis	Categorias	Pontuação Nakagomi ^{b)} (média)	Valor_p ^{a)}
Idade	< 6 meses	12,86	0,723
	7 – 12 meses	11,95	
	> 12 meses	11,88	
Rotavírus	Positivo	12,20	0,926
	Negativo	12,29	

a) Foi utilizado o teste estatístico T-Student para comparar valores médios e para determinar o valor de significância dos mesmos.

b) Segundo a escala de 20 pontos de Nakagomi (41), descrita nos Materiais e Métodos.

Ao avaliar-se a relação entre a gravidade dos sintomas e a idade das crianças incluídas no estudo, as crianças com idade igual ou inferior a 6 meses apresentavam uma gravidade média dos sintomas mais elevada (12,86 pontos, $p= 0,736$), quando comparadas com outras faixas etárias, mas estes resultados não são estatisticamente significativos pois só foi possível calcular a pontuação de gravidade dos sintomas para 42 crianças (Tabela 3.6).

Efetuiu-se uma avaliação do estado nutricional das crianças e constatou-se que a maioria (69,3%) apresentava peso normal para a idade, mas 20,2% tinha peso baixo em relação à idade ($Z < -2$ SD) e 10,7% mostrava um estado de subnutrição grave ($Z < -3$ SD) (Tabela 3.7). Encontrou-se também que 50,7% tinha estatura normal para a idade, mas 21,3% possuía estatura baixa para a idade ($Z < -2$ SD) e 28,0% apresentava um índice de malnutrição crónica ($Z < -3$ SD). Os valores de malnutrição crónica provavelmente devem-se a um défice nutritivo contínuo que condicionou o crescimento normal destas crianças. Quando comparado o peso das crianças relativamente à altura, verificou-se que 84,0% possuía um peso normal, somente 4,0% possuía peso baixo e um estado de malnutrição aguda moderada ($Z < -2$ SD), sendo que 12,0% apresentavam um índice de malnutrição aguda grave (Tabela 3.7). Em relação à idade observou-se que os índices de malnutrição são mais prevalentes em crianças com idade inferior a 12 meses (dados não apresentados).

Tabela 3.7. Indicadores de malnutrição e relação com a infecção por rotavírus em crianças < 5 anos do Huambo, Angola (2012).

Indicadores de Malnutrição	Z-score	Nº Crianças (n=75), n (%)	Rotavírus + (n=41), n (%)	Rotavírus – (n= 34), n (%)	Valor_ <i>p</i>^{a)}
Peso vs Idade	Z > -2 SD	52 (69,3)	29 (55,8)	23 (44,2)	0,563
	-3 SD < Z < -2 SD	15 (20,0)	9 (60,0)	6 (40,0)	
	Z < -3 SD	8 (10,7)	3 (37,5)	5 (62,5)	
Altura vs Idade	Z > -2 SD	38 (50,7)	20 (52,6)	18 (47,4)	0,777
	-3 SD < Z < -2 SD	16 (21,3)	10 (62,5)	6 (37,4)	
	Z < -3 SD	21 (28,0)	11 (52,3)	10 (47,6)	
Peso vs Altura	Z > -2 SD	63 (84,0)	33 (52,4)	30 (47,6)	0,660
	-3 SD < Z < -2 SD	3 (4,0)	2 (66,6)	1 (33,3)	
	Z < -3 SD	9 (12,0)	6 (66,6)	3 (33,3)	

^{a)} Foi utilizado o teste estatístico do Qui-quadrado para o cruzamento de dados e para determinar o valor significância dos mesmos.

3.2. Prevalência da Infecção por Rotavírus

A pesquisa de antígenos de rotavírus, nas 246 amostras de fezes colhidas, foi realizada em Angola através de um teste rápido imunocromatográfico. Em Portugal, efetuaram-se testes confirmatórios de uma série de amostras com resultados negativos (n=44) e inválidos (n=2) provenientes de Angola. A repetição dos testes confirmou os resultados negativos e os 2 resultados inválidos deram origem a resultados negativos. Assim, de entre as 246 amostras foram identificadas 92 positivas para rotavírus e 154 negativas, resultando numa prevalência média de 37,4% da infecção por rotavírus entre as amostras colhidas nos concelhos incluídos no estudo. As prevalências variaram entre um valor máximo de 72,7% observado entre as amostras colhidas no Centro de Saúde de Casseque III e um valor mínimo de 21,0% no Centro de Saúde da Mineira (Figura 3.1).

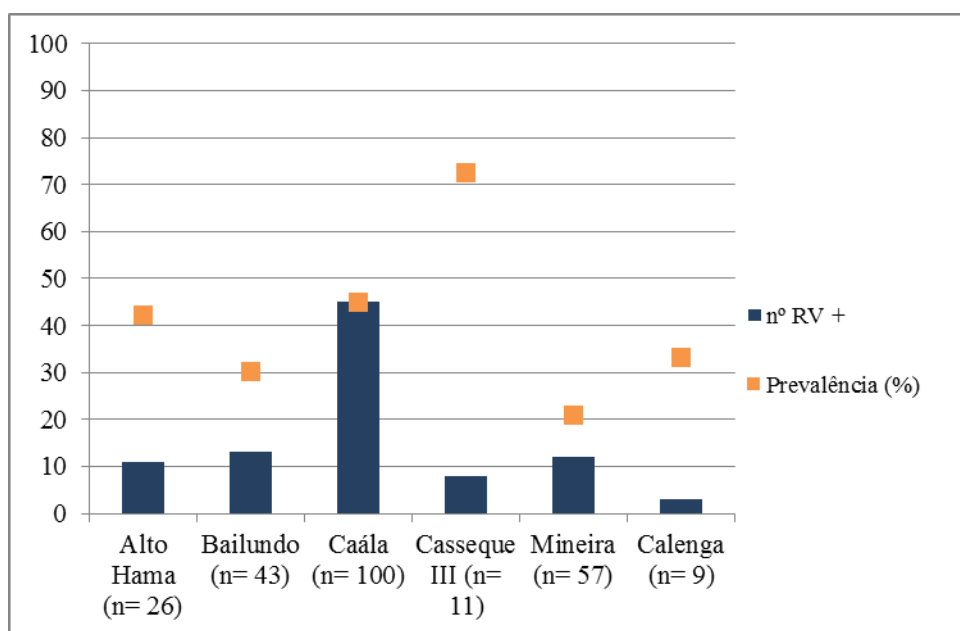


Figura 3.1. Distribuição da prevalência da infecção por rotavírus de acordo com os locais de colheita de amostras em Huambo, Angola (2012).

3.3. Caracterização Epidemiológica da Infecção por Rotavírus

Dos 95 inquéritos analisados, 49 correspondiam a crianças infetadas com rotavírus, diagnosticadas por teste rápido imunocromatográfico, e 46 a crianças com gastroenterite devida a outro agente etiológico não identificado.

O número de casos de gastroenterite observado foi maior entre os rapazes (60,0%), mas a infeção por rotavírus afetou igualmente os dois géneros (Tabela 3.2). A infeção por rotavírus foi encontrada em todos os grupos etários, ainda que com frequências diferentes. Assim, verificou-se ser mais comum em crianças com ≤ 6 meses, mas a diferença não tem significado estatístico (59,4%, $p = 0,560$). Por outro lado, as crianças residentes em áreas rurais tinham maior probabilidade de ter GEA (62,1%) e de esta ser causada por rotavírus (59,3%, $p = 0,053$) que as crianças que vivem na cidade (Tabela 3.2). Em relação à alimentação, a prevalência de rotavírus é semelhante entre o grupo de crianças exclusivamente amamentadas e as que não eram amamentadas.

Clinicamente, 89,8% das crianças infetadas com rotavírus tinha vômitos e verificou-se que estas tinham maior probabilidade de ter vômitos, quando comparadas com crianças infetadas por outro agente (67,4%, $p = 0,002$), e com uma maior frequência de episódios (3,1x/dia vs. 2,4x/dia, $p = 0,042$) (Tabelas 3.4 e 3.5). Observou-se ainda que cinco (10,2%) das crianças infetadas com rotavírus tinham vômitos mas não diarreia (Tabela 3.4). Ainda que em número reduzido ($n=5$), registou-se uma maior percentagem de crianças infetadas com rotavírus com uma temperatura axial $\geq 37,6$ °C, comparativamente com as crianças com diarreia de outra etiologia (10,2% vs. 4,3%, $p = 0,033$). Apesar da diferença não ser estatisticamente significativa ($p = 0,234$), 55,1% das crianças infetadas com rotavírus possuía desidratação e 36,7% níveis de atividade reduzida (Tabela 3.4). Quando se considera a escala de Nakagomi, constata-se que a gravidade dos sintomas é independente do tipo de infeção, mas estes resultados podem não ser significativos por abrangerem uma pequena parte da amostragem (Tabela 3.6). Igualmente, a comparação dos índices de malnutrição com a infeção por rotavírus não originou qualquer correlação significativa (Tabela 3.7).

3.4. Genótipos de rotavírus determinados por *hemi-nested multiplex PCR*

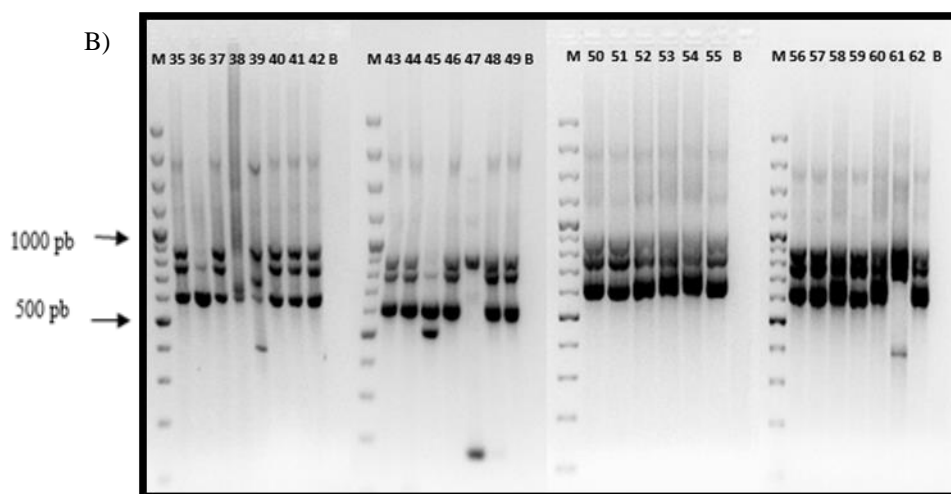
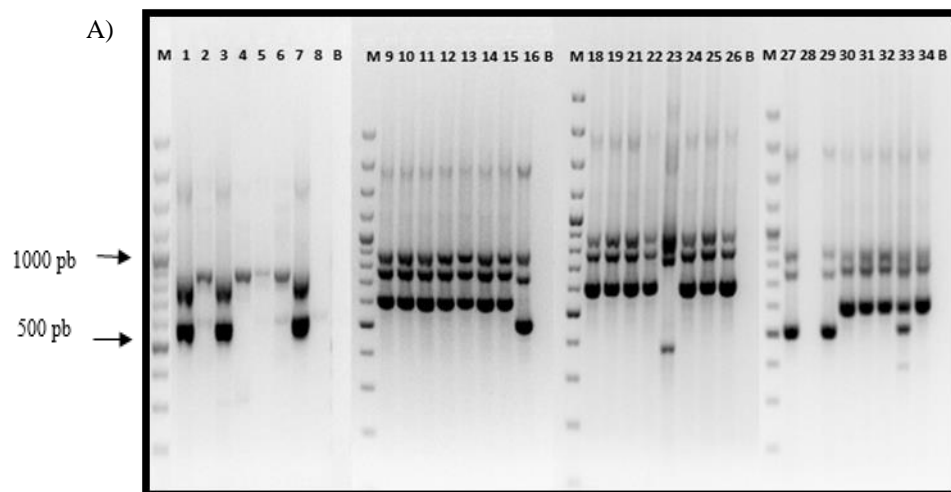
Para as 92 amostras de fezes positivas para rotavírus por teste rápido procedeu-se à extração do RNA, retrotranscrição do mesmo para cDNA e determinação dos genótipos G (gene de VP7) e P (gene de VP4) através de um ensaio de *hemi-nested multiplex PCR* e análise do produto de amplificação por eletroforese em gel de agarose. No anexo 3 estão descritos, para as amostras individuais, os resultados obtidos na 1ª e 2ª reação da *hemi-nested multiplex PCR* com base no tamanho dos fragmentos amplificados.

3.4.1. Genótipos G

Na 1ª reação de amplificação da sequência nucleotídica parcial do gene de VP7, em 90 amostras conseguiu-se visualizar um produto com uma mobilidade eletroforética compatível com o fragmento esperado de ~880 pb. Não se observou produto de amplificação para as amostras 8 e 28. Este facto pode refletir uma quantidade baixa de RNA viral, por exemplo devido a degradação, ou estirpes virais geneticamente divergentes em que não é possível a hibridação dos *primers* usados.

Na 2ª reação de PCR, em 89 amostras obtiveram-se produtos de amplificação (Figura 3.2). No entanto, em apenas 86 estes produtos possuíam dimensões correspondentes a genótipos específicos (Tabela 2.2, Capítulo 2- Materiais e Métodos). Assim, as amostras 4, 5 e 28, para as quais não se conseguiu obter banda com tamanho correspondente a um genótipo, foram consideradas não tipáveis (Gnt). Por outro lado, para as amostras 33, 39, 45, 71, 85 e 89 obtiveram-se 2 ou 3 bandas correspondentes a vários genótipos G que podem sugerir infeções por múltiplos genótipos (Gmix) (Anexo 6.3). Para além destas bandas, na maioria das amostras, surge um par de bandas adicionais, a maior das quais com tamanho compatível com o produto da 1ª reação de PCR e a outra com 750-780 pb devendo resultar de amplificação inespecífica, eventualmente por hibridação inespecífica do *primer* de G8 (Figura 3.2).

A Figura 3.2 mostra em três imagens (A, B e C) fotografias do padrão de mobilidade eletroforética dos produtos da 2ª reação de PCR. Cada imagem inclui 4/5 géis e em cada gel está incluído um marcador de tamanhos moleculares, produtos de 7 ou 8 amostras e um controlo negativo.



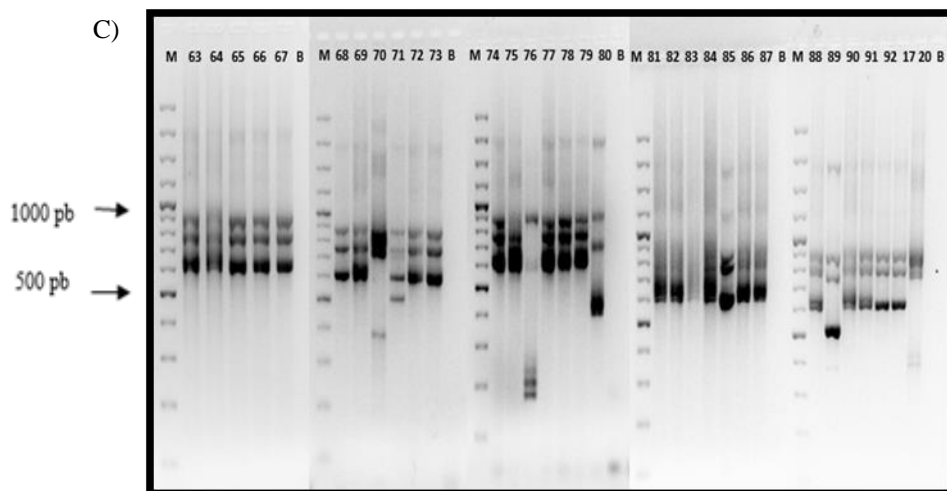


Figura 3.2. Padrão eletroforético dos produtos da 2ª reação de *hemi-nested multiplex PCR*, em 3 imagens A, B e C, para identificar os genótipos G de rotavírus a partir da amplificação do fragmento genômico codificador da VP7. A) Amostras de 1 a 34 (17 e 20 surgem no último gel); B) Amostras de 35 a 62; C) Amostras de 63 a 92, 17 e 20. M = Marcador de tamanhos moleculares *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder*, *Thermo Fisher Scientific*; B = Controlo negativo.

A análise dos géis revelou para 79,4% dos produtos a presença de uma banda compatível com um fragmento de 618 pb específico do genótipo G1. Também foram identificados produtos com tamanhos correspondentes aos genótipos G2, G4, G9 e G12 em percentagens entre 1,0% e 5,0% (Figura 3.3). Algumas amostras (n=6, 7%) deram origem a um padrão compatível com a presença de múltiplos genótipos G (G1/G2/G12, G1/G3/G12, G1/G2 e G2/12, Gmix) e em 3,3% (n=3) não foi possível determinar o genótipo (Gnt).

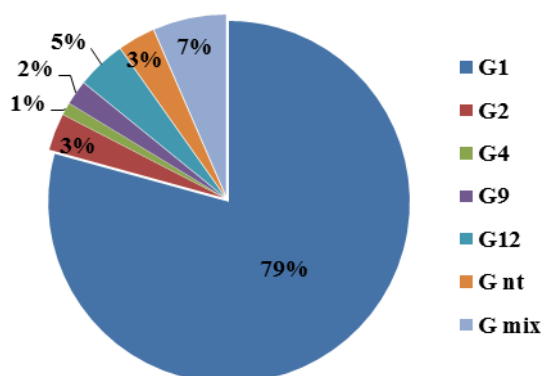


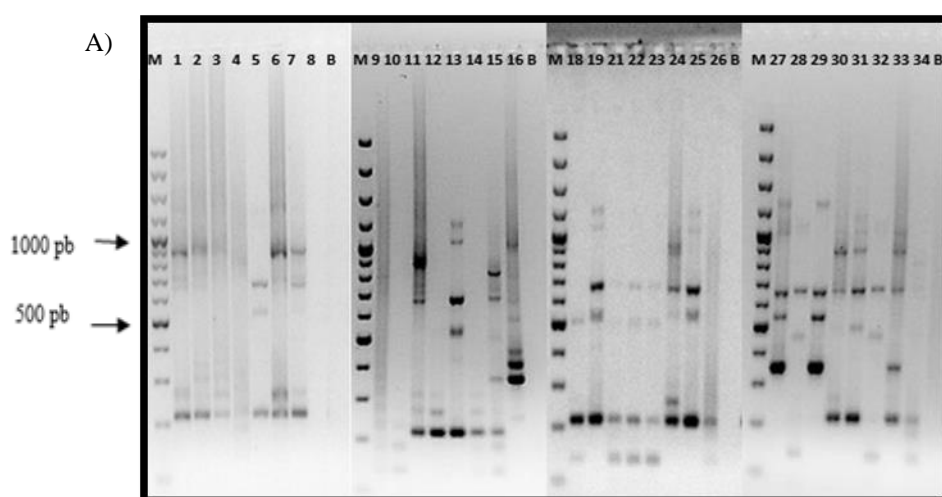
Figura 3.3. Representação gráfica da prevalência dos genótipos G de rotavírus identificados por *hemi-nested multiplex PCR*, em crianças <5 anos do Huambo, Angola (2012).

3.4.2. Genótipos P

Na 1ª reação de amplificação da sequência nucleotídica parcial do gene de VP4, para 87 amostras obteve-se um produto com mobilidade eletroforética compatível com o tamanho esperado de 663 pb. Em cinco amostras 8, 18, 21, 36 e 43 não se observou produto de amplificação, provavelmente devido a quantidade insuficiente de RNA viral na amostra, uma vez que todas as amostras deram origem a produtos na 2ª reação de PCR.

Quando da comparação do tamanho dos produtos obtidos na 2ª reação de PCR com as dimensões dos amplicões específicos dos diferentes genótipos P (Tabela 2.1, Capítulo 2- Materiais e Métodos), apenas em 74 amostras (80,4%) foi possível estabelecer correspondência. De entre estas, para 49 obtiveram-se bandas compatíveis com a presença de 2 ou mais genótipos P diferentes (*e.g.* P[4]/P[6], P[4]/P[8], P[6]/P[8], P[8]/P[9], P[8]/P[10], P[6]/P[10], P[6]/P[8]/P[11]) (Anexo 6.3). Em 18 amostras 8, 9, 36, 39, 47, 58, 59, 60, 61, 64, 66, 76, 83, 84, 85, 86, 88 e 90 não se conseguiu identificar bandas com tamanho correspondente a um genótipo

A Figura 3.4 mostra em três imagens (A, B e C) as fotografias obtidas da migração dos produtos de genotipagem P. Cada imagem inclui 4/5 géis e em cada gel estão incluídos um marcador de tamanhos moleculares, produtos de 7 ou 8 amostras e um controlo negativo.



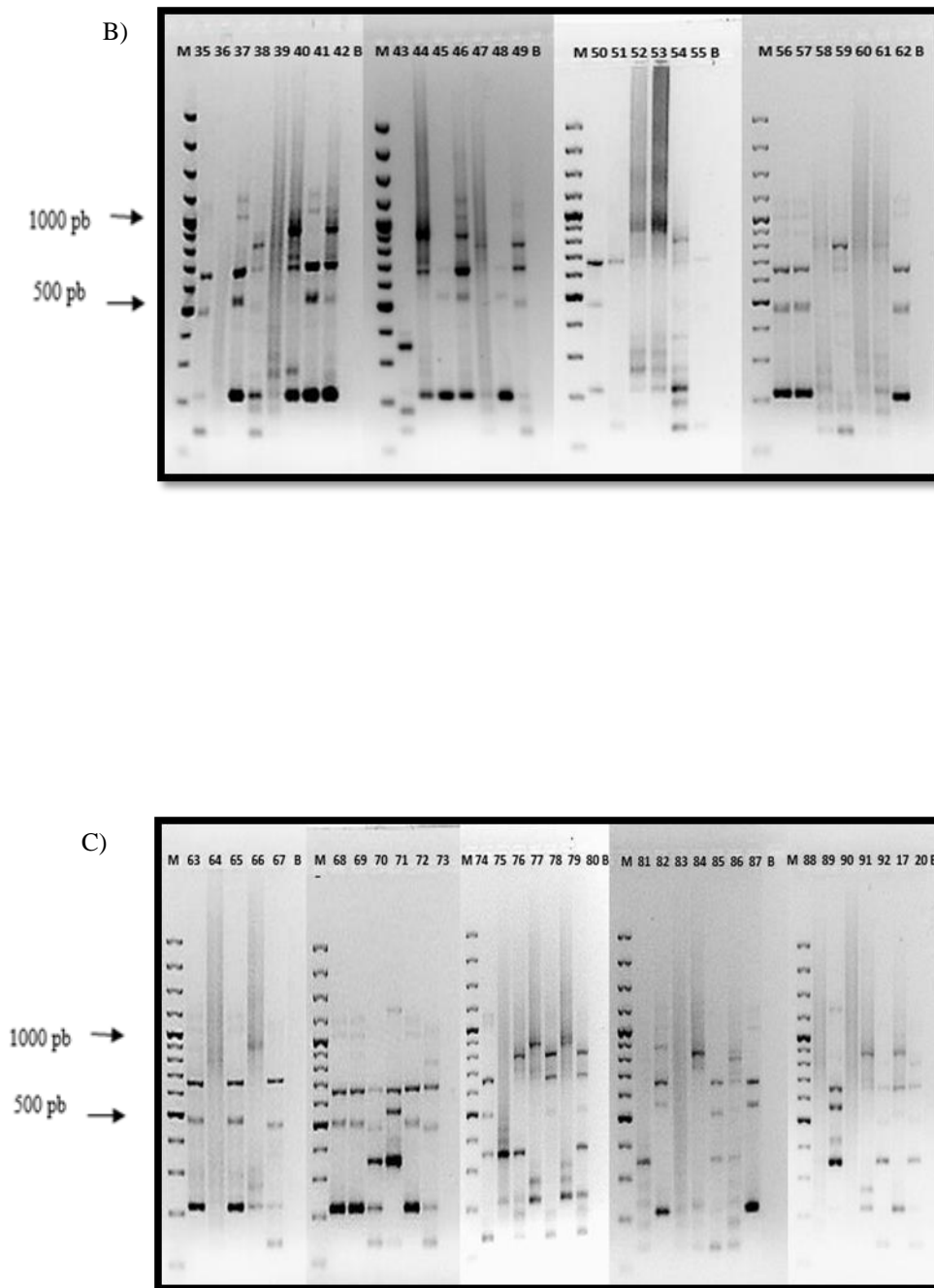


Figura 3.4. Padrão eletroforético dos produtos da 2ª reação *hemi-nested* multiplex PCR, em 3 imagens A, B e C, para identificar os genótipos P a partir da amplificação do fragmento genômico codificador da VP4. A) Amostras 1 a 34 (17 e 20 aparecem no último gel); B) Amostras 35 a 62; C) Amostras 63 a 92, 17 e 20. M = Marcador do tamanho molecular *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder*, Thermo Fisher Scientific; B = Controlo Negativo.

Uma característica geral do padrão eletroforético obtido quando da determinação do genótipo P das mostras estudadas é a multiplicidade e heterogeneidade de bandas observadas. Na maioria das amostras, para além de uma primeira banda com um tamanho aproximado de 660 pb, correspondendo provavelmente ao produto da 1ª reação, são observadas várias outras bandas sem correspondência de tamanho com um genótipo P resultantes de amplificação inespecífica e que impossibilitam a genotipagem. A análise dos géis revelou em 21,7% das amostras um produto com tamanho aproximado de 224 pb, característico do genótipo P[8]. Também foram identificados os genótipos P[6] e P[4], em 2,0% e 3,0% das amostras, respetivamente. Uma percentagem muito expressiva das amostras, 53,3%, apresentaram bandas correspondentes a vários genótipos P (Pmix) e em 19,6% não foi identificado o genótipo (Pnt) (Figura 3.5).

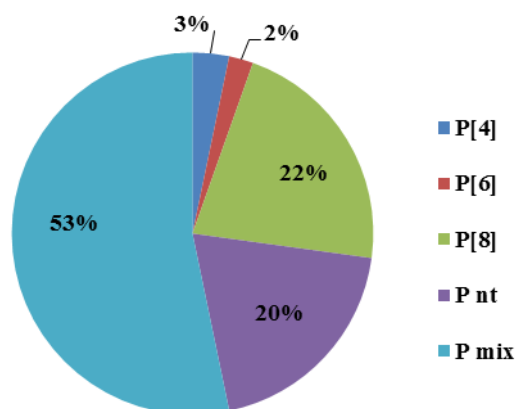


Figura 3.5. Representação gráfica da prevalência dos genótipos P de rotavírus identificados por *hemi-nested multiplex PCR*, em crianças <5 anos de Huambo, Angola (2012).

3.4.3. Combinações de genótipos G e P

As combinações de genótipos G e P revelaram a presença de 3 combinações diferentes de genótipos individuais. A combinação mais prevalente é G1P[8] correspondendo a 19,6% das amostras, seguida de G2P[4] e G1P[6] cada uma em 2,2% (Tabela 3.8). Em 42,4% das amostras, G1 surge associado a vários genótipos P (Pmix) e está associado a genótipos não identificados (Pnt) em 15,2%. Para 22,9% das amostras, o ensaio usado não permitiu identificar um dos genótipos.

Tabela 3.8. Combinações de genótipos G/P de rotavírus, identificados por *hemi-nested multiplex PCR*, circulantes em Huambo, Angola (2012).

Genótipos (%)	G1	G2	G4	G9	G12	Gmix	Gnt	Total
P[4]	—	2 (2,2)	—	—	—	1 (1,1)	—	3 (3,3)
P[6]	2 (2,2)	—	—	—	—	—	—	2 (2,2)
P[8]	18 (19,5)	—	—	—	—	1 (1,1)	1 (1,1)	20 (21,6)
Pmix	40 (43,4)	1 (1,1)	1 (1,1)	—	3 (3,3)	2 (2,2)	2 (2,2)	49 (53,3)
Pnt	13 (14,1)	—	—	2 (2,2)	1 (1,1)	2 (2,2)	—	18 (19,6)
Total	73 (79,2)	3 (3,3)	1 (1,1)	2 (2,2)	4 (4,4)	6 (6,5)	3 (3,3)	92 (100,0)

3.5. Detecção do gene de VP6

A ausência de amplificação de fragmentos genômicos de rotavírus com os *primers* de consenso largamente usados na 1ª reação de PCR poderá ser devida à reduzida quantidade de RNA viral matriz presente na amostra, à degradação durante o processamento ou ainda devido a diferenças entre as sequências dos *primers* usados e as correspondentes sequências virais alvo. Para se confirmar a presença de genoma de rotavírus nas amostras 8, 18, 21, 28, 36 e 43, para as quais não se conseguiu produto de amplificação na 1ª reação de PCR do fragmento genômico parcial do gene da VP7 ou da VP4, procedeu-se à amplificação por PCR da sequência nucleotídica parcial do gene de VP6 (nucleótidos 747-1126). Conseguiu-se amplificar um fragmento de tamanho aproximado de 379 pb em todas as amostras exceto para a amostra 8 (dados não apresentados). Assim, a ausência de produto de amplificação nestas amostras para os genes de VP4 ou de VP7 deverá ser devido a alterações genéticas no local de hibridação de um dos *primers* usados. É possível que a banda muito fraca, correspondente a um tamanho aproximado de 618 pb, identificativa do genótipo G1 na amostra 8, após a 2ª reação para o gene de VP7, se deva a contaminação com outros produtos de amplificação.

3.6. Identificação de Genótipos através da Análise de Sequências Nucleotídicas

Face ao padrão complexo de bandas resultante da análise dos produtos de *hemi-nested multiplex PCR* para genotipagem dos rotavírus em estudo, designadamente no que respeita ao gene de VP4, decidiu-se proceder à genotipagem por sequenciação e análise de sequências nucleotídicas obtidas para as amostras de rotavírus i) não tipáveis (Gnt=3; Pnt=18), ii) com produtos correspondentes a múltiplos genótipos (Gmix=6, Pmix=30), iii) com genótipos pouco comuns (n=2 G9, n=4 G12, n=2 P[6]) e ainda iv) amostras aleatórias para confirmação dos resultados de *hemi-nested multiplex PCR* (n=27 para G, n=5 para P). Embora 49 amostras de rotavírus possuíssem padrão de múltiplos genótipos foram selecionados apenas 30 para sequenciação, 11 correspondentes a padrões Pmix mais comuns (3/8 P[6]/P[8]; 3/14 P[8]/P[9]; 4/6 P[8]/P[10] e 1/2 P[4]/P[8]) e 19 dos restantes.

O produto da 1ª reação de PCR usado na sequenciação não foi obtido para 3 das 18 amostras não tipáveis para P (amostras 8, 36, 83) e 1 das 6 com múltiplas bandas para G (amostras 45). Assim, no total foram sequenciados genes de 53 amostras de rotavírus, ambos os genes em 38, o gene de VP4 em 12 e o gene de VP7 em 3.

As sequências obtidas foram editadas e submetidas a uma pesquisa de homologia com sequências disponíveis na base de dados do NCBI, usando a ferramenta *Nucleotide BLAST*. A identificação do genótipo fez-se através da correspondência com sequências de genótipo conhecido com identidade de sequências $\geq 98\%$ em toda a extensão da sequência questionada (Anexo 4). Relativamente às 3 amostras Gnt, duas foram identificadas como G1 e uma como G12, enquanto para as cinco Gmix, duas eram G1, duas G2 e uma G12. Curiosamente, 4 estirpes identificadas como G12 por *hemi-nested multiplex PCR* revelaram-se G8 por *BLAST* e 1 G4 por *hemi-nested multiplex PCR* foi identificada como G12 por *BLAST*. Os restantes genótipos G previamente atribuídos por *hemi-nested multiplex PCR* foram todos confirmados por *BLAST*. Das 15 amostras sem genótipo P (Pnt), 14 foram identificadas como P[6] e 1 como P[8]. As amostras de rotavírus com um padrão P[6]/P[8] foram todas identificadas como P[6] e as amostras P[4]/P[8], P[8]/P[9] ou P[8]/P[10] como P[8]. Nem todas as amostras com estes padrões foram sequenciadas. No entanto, ainda que podendo incorrer em erro, os resultados das amostras selecionadas foram transpostos para as que tinham padrões eletroforéticos semelhantes. Das 19 amostras com outros padrões de múltiplos genótipos P, 17 foram identificadas como P[6] e 2 como P[4]. No total, a pesquisa *BLAST* permitiu que das 49 amostras identificadas com múltiplos genótipos P por *hemi-nested multiplex PCR*, 25 fossem genotipadas como P[6], 22 como P[8] e 2 como P[4].

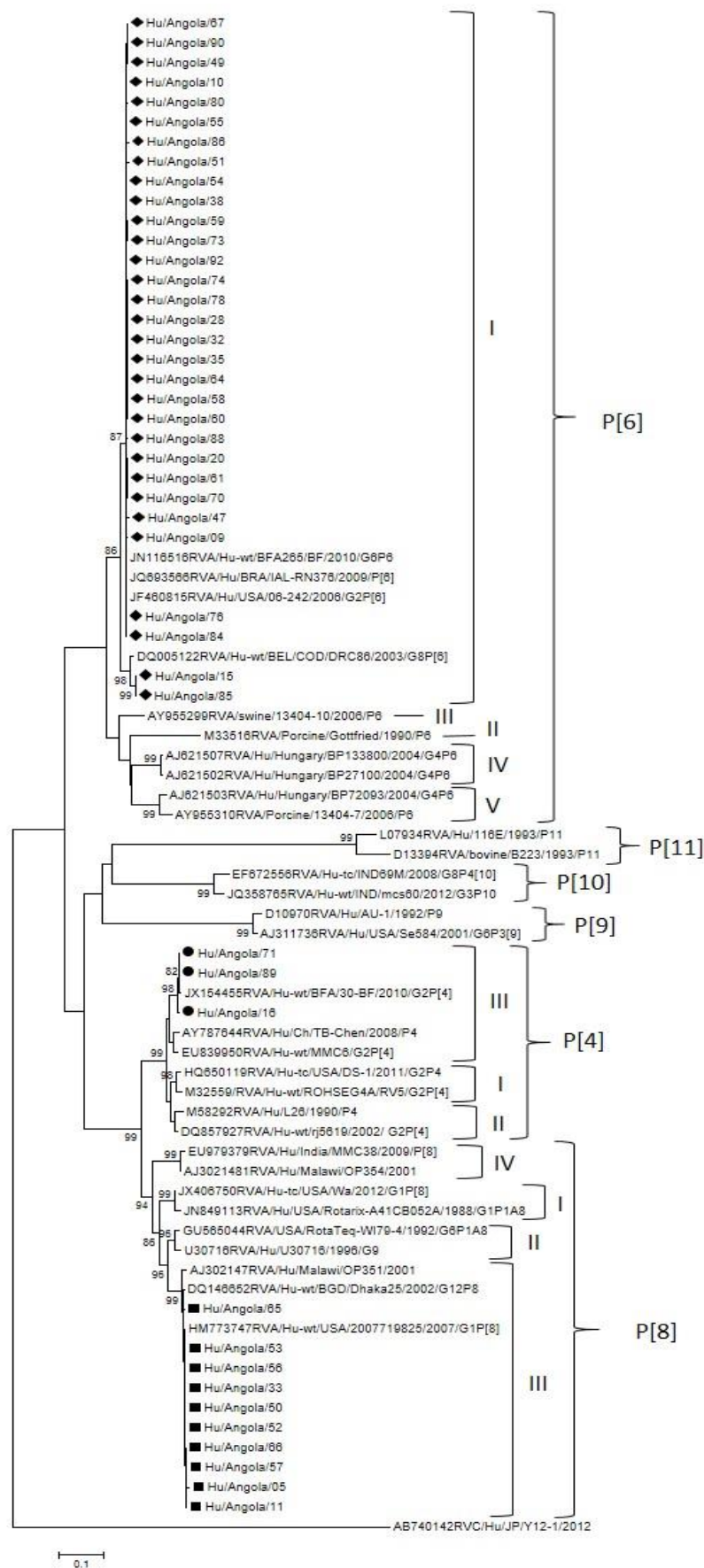
Para confirmar os resultados de genotipagem obtidos através da pesquisa *BLAST* e ainda para estabelecer relações filogenéticas entre os rotavírus analisados e destes com outros rotavírus com sequências depositadas nas bases de dados, designadamente estirpes de referência ou provenientes de localização geográfica próxima, procedeu-se à construção de árvores filogenéticas para a sequência parcial dos genes codificadores de VP7 (Fig. 3.6-A) e de VP4 (Fig. 3.6-B). Nos alinhamentos foram usadas 39 sequências nucleotídicas de VP7 (nt 51-932) e 44 de VP4 (nt 132-795).

As restantes sequências (duas e seis, respetivamente para VP7 e VP4) tinham um comprimento mais curto e a sua utilização gerava perda de informação na construção das árvores, pelo que não foram incluídas na análise. As estirpes de referência usadas são representativas dos genótipos com maior prevalência global (G1, G2, G3, G4, G9, P[4], P[8] ou ainda identificados nas amostras estudadas (G8, G10, G12, P[6], P[9], P[10] e P[11]) e abrangem as principais linhagens descritas dentro de cada genótipo.

Globalmente, a análise das duas árvores revela um elevado grau de inferência filogenética, havendo uma separação distinta dos grupos de sequências pertencentes a diferentes genótipos, com os diferentes agrupamentos suportados por valores de *bootstrap* elevados, designadamente 99% para a maioria dos genótipos (Figura 3.6). Todos os genótipos atribuídos com base na pesquisa *BLAST* foram confirmados por inferência filogenética. Também, de um modo geral, as amostras estudadas não apresentam ramos horizontais ou estes são muito curtos, indicando um grau reduzido de divergência genética relativamente a uma estirpe ancestral comum.

Relativamente às sequências do gene de VP4 (Figura 3.6-A), a maioria agrupa-se com sequências da linhagem I do genótipo P[6]. Porém, ainda na linhagem P[6]-I duas sequências angolanas (Hu/Angola/15 e 85) formam um subgrupo separado (98% de *bootstrap*) com uma sequência de rotavírus da República Democrática do Congo (DQ005122RVA/Hu-wt/BEL/COD/DRC86/2003/G8P[6]) sugerindo uma origem distinta para estes dois vírus. No entanto, não se observa formação de agrupamentos das sequências P[6] de acordo com o genótipo G, encontrando-se dispersas as sequências P[6] das combinações G8P[6] e G9P[6] com as de G1P[6]. As estirpes de rotavírus com genótipo P[8] formam um grupo monofilético com vírus da linhagem P[8]-III com origem geográfica diversa. As estirpes vacinais Rotarix e RotaTeq segregam em linhagens diferentes, P[8]-I e P[8]-II, respetivamente. Os vírus P[4] estão estreitamente relacionados com uma estirpe G2P[4] circulante no Burkina Faso (JX154455RVA/Hu-wt/BFA/30-BF/2010/G2P[4]), formando um agrupamento com outros vírus da linhagem P[4]-III.

(A)



(B)

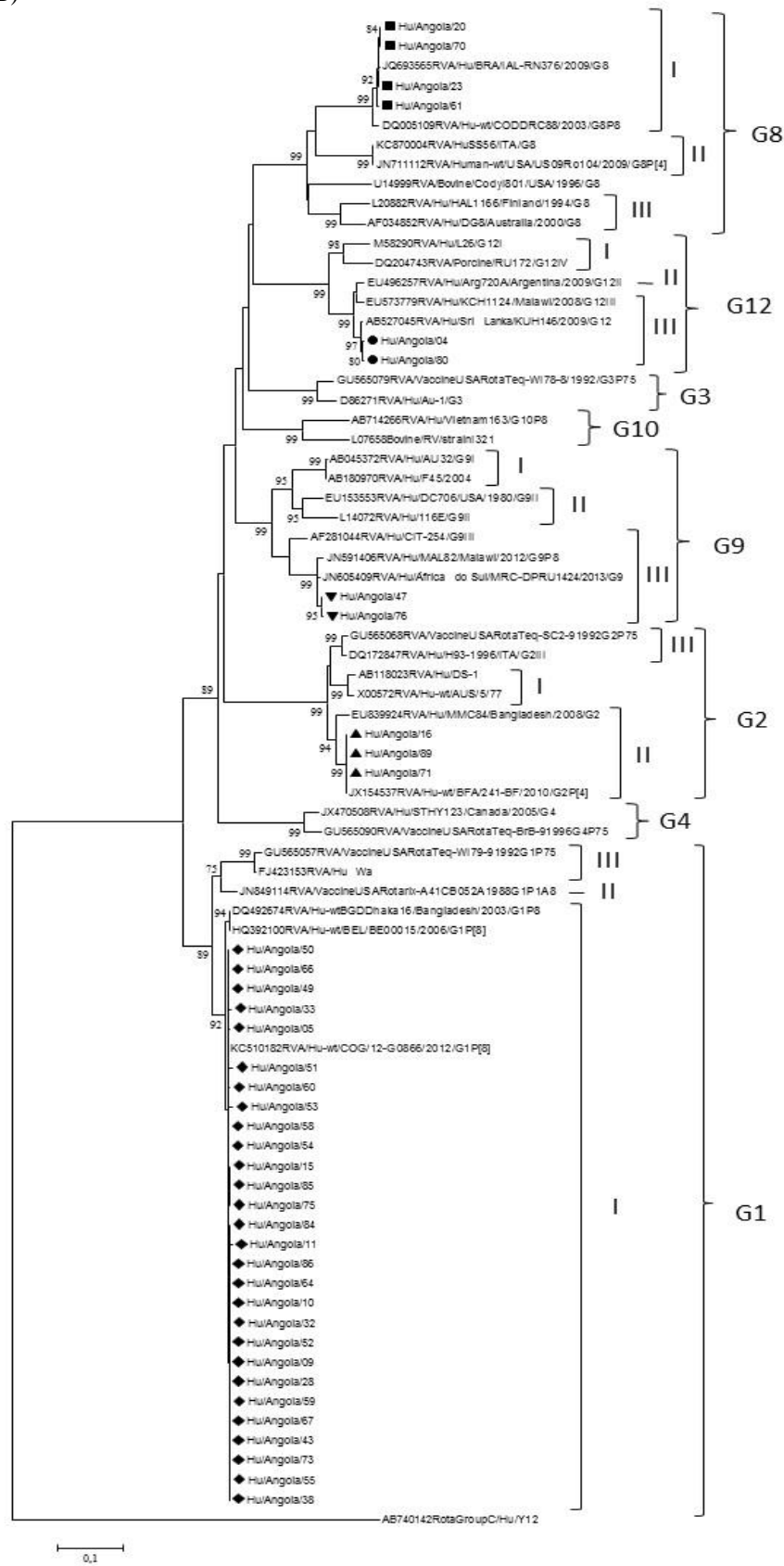


Figura 3.6. Análise filogenética das sequências nucleotídicas do gene de VP4 (A) e do gene de VP7 (B) de rotavírus presentes em amostras do Huambo, Angola (2012), e de sequências de referência de rotavírus do grupo A disponíveis nas bases de dados. A sequência correspondente da estirpe AB740142 de rotavírus humano do grupo C foi usada como *outgroup*. A robustez da inferência filogenética foi testada por *bootstrapping* de 1000 replicados sendo apresentados apenas os valores superiores a 70%. Os símbolos geométricos a cheio que precedem as sequências angolanas são usados para facilitar a sua localização na árvore.

No que respeita ao gene de VP7 (Figura 3.6-B), a maioria das estirpes agrupa-se com sequências de rotavírus do genótipo G1 retiradas da base de dados GenBank com um valor de *bootstrap* de 92% e estão estreitamente relacionadas com uma estirpe G1P[8] circulante em 2012 na República Democrática do Congo (KC510182RVA/Hu-wt/COG/12-G0866/2012/G1P[8]). Todas as estirpes G1 analisadas estão uniformemente distribuídas pela linhagem G1-I, enquanto as estirpes vacinais de Rotarix e RotaTeq segregam nas linhagens G1-II e G1-III, respetivamente (Figura 3.6-B). Curiosamente, dentro da linhagem I não se observa qualquer formação de agrupamentos distintos que segreguem as estirpes G1 das combinações G1P[8] e G1P[6], o que sugere eventos de redistribuição recentes. As três estirpes G2 estão incluídas na linhagem G2-II e estão estreitamente relacionadas com a referência (JX154537RVA/Hu-wt/BFA/241-BF/2010/G2P[4]) circulante no Burkina Faso e afastadas da estirpe vacinal de RotaTeq (linhagem G2-III). Os rotavírus Angolanos G9 segregam com a linhagem G9-III e estão estreitamente relacionados com uma estirpe da África do Sul (JN605409RVA/Hu/ÁfricadoSul/MRC-DPRU1424/2013/G9) e com outra do Malawi (JN591406RVA/Hu/MAL82/Malawi/2012/G9P8) recentemente descritas. As estirpes G8 formam um agrupamento, suportado por um valor de *bootstrap* de 99%, com rotavírus da linhagem G8-I do Brasil (JQ693565RVA/Hu/BRA/IAL-RN376/2009/G8) e da República Democrática do Congo (DQ005109RVA/Hu-wt/CODDRC88/2003/G8P8). As duas amostras de rotavírus G12 de Angola estão incluídas na linhagem G12-III e estão estreitamente relacionadas entre si e com uma estirpe do Sri Lanka (AB527045RVA/Hu/Sri Lanka/KUH146/2009/G12).

Os resultados de genotipagem por análise de sequências dos rotavírus circulantes no Huambo permitiram estabelecer novas combinações de genótipos G e P relativamente aos resultados de *multiplex PCR* (Tabela 3.8), assim como novos valores de prevalências dos diferentes genótipos G/P.

No total foram identificadas 6 combinações, com uma prevalência relevante de G1P[8] presente em 45,7% das amostras e de G1P[6] em 34,8%. As restantes combinações G2P[4], G8P[6], G9P[6] e G12P[6], representam 2,2% a 5,4% das amostras estudadas (Tabela 3.9).

É de salientar a redução de estirpes parcialmente não tipáveis (n=21 *versus* n=4), o desaparecimento de amostras com múltiplos genótipos que anteriormente representavam mais de metade das amostras analisadas (53/92) e a elevada prevalência de rotavírus G1P[6], uma combinação pouco prevalente a nível global.

Tabela 3.9. Combinações genotípicas de rotavírus circulantes na região de Huambo, Angola (2012).

Genótipos (%)	G1	G2	G8	G9	G12	Gnt	Total
P[8]	42 (45,6)	—	—	—	—	1 (1,1)	43 (46,7)
P[6]	32 (34,8)	—	4 (4,3)	2 (2,2)	3 (3,3)	—	41 (44,6)
P[4]	—	5 (5,4)	—	—	—	—	5 (5,4)
Pnt	3 (3,3)	—	—	—	—	—	3 (3,3)
Total	77 (83,7)	5 (5,4)	4 (4,3)	2 (2,2)	3 (3,3)	1 (1,1)	92 (100,0)

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Em Angola, a diarreia é uma das principais causas de morte infantil, estimando-se que os rotavírus sejam responsáveis por um terço das hospitalizações por gastroenterite aguda em crianças com menos de 5 anos de idade (68). Neste estudo, realizado na região do Huambo em 2012, encontrámos uma prevalência média de infeção por rotavírus de 37,4% entre as crianças incluídas no estudo. Este valor é muito próximo do estimado pela OMS a nível global (36%) em crianças com menos de 5 anos de idade hospitalizadas devido a diarreia (94). A prevalência encontrada é ligeiramente inferior à descrita para África (40%, gama 29%-52%) (95) e poderá refletir o facto da população alvo deste estudo não ser constituída por crianças hospitalizadas.

No conjunto das amostras analisadas com inquéritos disponíveis, observou-se que 98% das amostras positivas eram provenientes de crianças com ≤ 24 meses de idade, confirmando a elevada incidência de gastroenterite por rotavírus durante os dois primeiros anos de vida (95, 96, 97). A faixa etária que registou maior prevalência de rotavírus (59,4%) foi a dos 0-6 meses. Este resultado, igualmente observado num estudo de prevalência de rotavírus realizado no Quénia (99), é um pouco inesperado uma vez que, genericamente, se considera a amamentação como um fator protetor da diarreia nesta faixa etária (100). No entanto, alguns estudos demonstraram que a proteção contra rotavírus pelo leite materno é eficaz quando este é dado regularmente e em volumes apreciáveis, *i.e.* amamentação exclusiva (101, 102). Os dados obtidos poderão dever-se ao número reduzido de crianças com amamentação exclusiva na população analisada (Tabela 3.3.). No entanto, a proteção contra a diarreia por rotavírus conferida pela amamentação está longe de ser consensual e outras medidas preventivas (*e.g.* vacinação e suplemento de zinco) são aconselhadas independentemente da alimentação praticada (103).

Um outro aspeto interessante deste estudo reside no facto de a maioria das crianças incluídas residirem em zonas rurais (62,1%). A maior parte dos estudos realizados em países de baixa renda, especialmente em África, engloba crianças de áreas urbanas e periurbanas, existindo um número muito limitado de trabalhos em zonas rurais (104, 105, 106, 107). De facto, foi nas zonas rurais do Huambo que encontrámos uma percentagem mais elevada de crianças infetadas com rotavírus (59,3% vs. 38.9%).

O estatuto socio-económico desta região tem muitas debilidades e as comunidades rurais não têm acesso a sistemas de saneamento, frequentemente defecando na proximidade de pontos de água e partilhando estes com animais, circunstâncias que podem contribuir para a transmissão de rotavírus. Comparativamente com os casos de gastroenterite causados por outros agentes etiológicos, na gastroenterite por rotavírus observámos uma maior proporção de crianças com vômitos (89,8% vs. 67,4%, $p=0,002$) e uma maior frequência destes (Tabelas 3.4 e 3.5). Uma diferença significativa nestas características clínicas em associação com a doença por rotavírus foi igualmente descrita noutros estudos (97, 98). A título de exemplo, num estudo desenvolvido no Zimbabué observou-se também uma maior proporção de crianças com vômitos infetadas por rotavírus em comparação com crianças não infetadas (77% vs. 57%, $p=0,001$) (108).

Conhecer a epidemiologia molecular dos rotavírus é relevante para a vigilância da doença e monitorização após implementação da vacinação. Com o objetivo de identificar os genótipos G e P dos rotavírus circulantes no Huambo, recorreu-se ao método largamente usado de *hemi-nested multiplex PCR*, com *primers* genéricos numa primeira reação de amplificação e *primers* específicos de genótipo numa segunda reação de PCR, seguido de eletroforese em gel de agarose, proposto por Gouvea *et al.* e Iturriza-Gómara *et al.* em 1990 e 2004, respetivamente (78, 86). Porém, uma das dificuldades associadas à utilização deste método de genotipagem consistiu na grande quantidade de estirpes não tipáveis, *i.e.* cujo padrão eletroforético não se identificava com o de qualquer genótipo específico. No total, 23% dos vírus não foram genotipados por este método para o gene de VP4 ou de VP7 (genótipos P e G, respetivamente), sendo particularmente relevante para o gene de VP4 por corresponder a 19,6% do total das amostras analisadas (Tabela 3.8). A incapacidade de identificar genótipos de rotavírus por *hemi-nested multiplex PCR* é estimada como sendo de 10-30%, devendo-se principalmente à acumulação de mutações pontuais no local de hibridação dos *primers* e à diversificação de linhagens específicas que não foram consideradas quando do desenho dos *primers* correntemente usados (11, 109, 110, 111, 112, 113). Assim, não é de estranhar a tendência para valores mais elevados de vírus não tipáveis em amostras de países de baixa renda onde é maior a diversidade genética dos rotavírus circulantes.

Para África, duas revisões sistemáticas estimaram em 16,3% (com valores máximos de 57 e 73% para o Gana e Nigéria, respetivamente) e 10,7% no período de 1997-2006 (114, 11). Outro estudo realizado no contexto da *African Rotavirus Surveillance Network* (ARSN) em 11 países Africanos (2006-2008) encontrou 30% de amostras não tipáveis (95). Dezassete (81%) das 21 amostras Angolanas não genotipadas por este método foram genotipadas com êxito através da sequenciação do amplicão da primeira reação de PCR e análise filogenética das sequências nucleotídicas. Três das 4 amostras não foram genotipadas por análise de sequências devido à incapacidade de obter produto na primeira reação de PCR, presumivelmente por causa da concentração reduzida do RNA viral extraído da amostra.

Quando da validação por sequenciação/análise de sequências das estirpes G12 identificadas por *multiplex-PCR*, estas revelaram-se como G8 por pesquisa *BLAST* e análise filogenética. Esta incorreção na genotipagem deve-se com grande probabilidade à hibridação inespecífica do *primer* G12 com a sequência das estirpes G8. De facto, a comparação das sequências destas estirpes G8 no local de hibridação do *primer* G12 com a sequência do *primer* G12 usado revelou discordância de apenas 3 posições nucleotídicas num total de 20 (dados não apresentados). A genotipagem errada de estirpes G8 como sendo G12 foi anteriormente descrita por F. Aladin (113) e igualmente atribuída a uma diferença de 3 posições nucleotídicas, duas delas coincidentes com as nossas. Na sequência deste problema, aqueles autores desenharam um novo *primer* para o genótipo G12. Outras incorreções de genotipagem referidas na literatura incluem a genotipagem de G3 como G10 (115) e de G9 como G3 (116). O ensaio de *hemi-nested multiplex PCR* tem sido considerado o método de eleição para a genotipagem dos rotavírus e considerado o *gold standard* (109). No entanto, o problema de potenciais erros de genotipagem reforça a necessidade da monitorização regular da especificidade e sensibilidade do *multiplex-PCR* através da análise das respetivas sequências nucleotídicas e adequação dos *primers* usados. Porém, a modificação dos *primers* no caso do *multiplex-PCR* não está isenta de dificuldades face ao elevado número de *primers* presente em cada reação e consequente dificuldade de otimização de condições de amplificação como sejam concentração de $MgCl_2$ e temperatura de hibridação.

Uma outra consequência da ligação inespecífica de *primers* poderá ser um padrão eletroforético correspondente a múltiplos genótipos e, consequentemente, sugestivo de uma infecção mista. Em 56% das amostras genotipadas observou-se este tipo de padrão para um ou ambos os genes analisados. Este valor é substancialmente mais elevado do que os descritos na literatura mesmo para países com grande diversidade de rotavírus circulantes. Duas revisões sistemáticas da diversidade dos rotavírus circulantes em África, entre 1996 e 2007, baseadas maioritariamente em resultados de *multiplex-PCR*, estimam o nível médio de infeções mistas em 7,2% e 12,4%, o intervalo de percentagens de genótipos mistos variando entre valores máximos de 45-66% para a Guiné-Bissau e 0% para o Quênia ou Líbia (11, 114). Outro estudo recente realizado pela ARSN, 2007-2011, usando dados fornecidos por 16 países das diferentes regiões Africanas mostrou níveis médios de 9,8% para genótipos P mistos e de 7,7% para genótipos G mistos (75). Assim, numa tentativa de elucidar o elevado número de genótipos mistos, designadamente os genótipos P mistos, procedeu-se também à análise da sequência nucleotídica dos respetivos produtos da primeira reação de PCR. Curiosamente, a inspeção do cromatograma e a correspondente sequência nucleotídica não revelaram quaisquer posições com polimorfismos, sendo identificado apenas um genótipo para as amostras individuais analisadas. Perante a impossibilidade de sequenciar todas as amostras com um padrão de infecção mista, procedeu-se à sequenciação de um número limitado de amostras (30 de um total de 49) e extrapolação do resultado de genotipagem para amostras não sequenciadas mas com padrão eletroforético idêntico. Como resultado desta abordagem deixámos de ter infeções mistas correndo o risco de estar a incorrer em erro. O facto de os cromatogramas só mostrarem inequivocamente sequências de espécies moleculares que estão presentes numa concentração superior a 20% pode levar à perda de outras sequências menos abundantes eventualmente presentes. Uma forma de esclarecer a presença de múltiplos genótipos de rotavírus, nomeadamente para algumas destas amostras com genótipos raros (*e.g.* P[10], P[11]), será através da clonagem do produto de PCR e sequenciação de um número considerável de clones (*e.g.* cerca de 20).

A caracterização genética dos rotavírus circulantes no Huambo demonstrou como dominantes os genótipos G1 (83,7%), P[8] (46,7%) e P[6] (44,6%) presentes maioritariamente nas combinações G1P[8] (45,6%) e G1P[6] (34,8%).

Estas prevalências do genótipo G1 e da combinação G1P[8] são consideravelmente elevadas comparativamente com os valores normalmente descritos para o continente Africano. A nível global, G1 e P[8] são responsáveis por 43% e 65%, respetivamente, das infeções por rotavírus e na combinação G1P[8] por 37,7%. Porém, >70% das infeções por rotavírus G1P[8] ocorre na Europa, América do Norte e Austrália. Em África G1 e P[8] individualmente apresentam prevalências de 28,8% e 40,6%, respetivamente, e apenas cerca de um quinto das infeções é atribuível ao genótipo G1P[8] (114, 75).

P[6] é o terceiro genótipo mais predominante do gene de VP4 dos rotavírus a seguir a P[8] e P[4], a nível mundial, as estirpes P[6] têm sido descritas em associação com uma enorme variedade de genótipos G e em constelações de genótipos tipo Wa e tipo DS-1 (117, 118, 119). Entre 2007 e 2011, a prevalência média do genótipo P[6] circulante em África foi de 30,9% com grandes flutuações anuais e por áreas geográficas, registando-se valores superiores a 60%, em 2007, no Sul de África e na África Ocidental e em 2011 na África Central (75). A combinação G1P[6] é considerada globalmente pouco comum (gama de prevalência 0,2-2%) (11) e em África, no período de 2007-2011, estima-se que nos 16 países Africanos da rede ARSN tenha sido responsável por 4,9% das infeções (gama 7,7%-3,4% ao longo dos 5 anos do estudo). Na região do Huambo a prevalência da combinação G1P[6] é surpreendentemente elevada (34,8%, Tabela 3.9). Curiosamente, apesar de não se ter observado uma correlação significativa entre combinações de genótipos e idade, 57% das infeções com estes vírus ocorre em crianças dos 0-6 meses, enquanto para G1P[8] apenas 25% das infeções se situam nesta faixa etária. Apesar dos rotavírus P[6] causarem diarreia em crianças, têm sido predominantemente associados a infeções assintomáticas de recém-nascidos (120). O genótipo P[6] também tem sido descrito como um dos principais genótipos de VP4 dos rotavírus de suínos (123). Assim, será interessante analisar o restante complemento genético destes vírus, comparar com sequências de estirpes causadoras de infeções assintomáticas e averiguar se têm origem animal através da redistribuição genética de segmentos genómicos.

A análise filogenética dos rotavírus circulantes no Huambo demonstrou dentro de cada genótipo dos genes de VP4 e VP7 analisados uma grande homogeneidade de estirpes virais.

Assim, para cada genótipo individual as estirpes encontram-se distribuídas por uma única linhagem (P[4]-III, P[6]-I, P[8]-III, G1-I, G2-II, G8-I, G9-II e G12-III) e, por sua vez, dentro de cada uma das linhagens os ramos de cada amostra são muito curtos ou inexistentes, refletindo uma reduzida diversificação dos vírus e uma introdução recente. Por outro lado, a existência de uma linhagem única G1 cocirculando com dois genótipos P diferentes (P[6] e P[8]) e de uma linhagem única P[6] cocirculando com vários genótipos G diferentes (G1, G2, G8, G9 e G12), sem que se verifique segregação em agrupamentos distintos nas árvores filogenéticas de acordo com as diferentes combinações de genótipos GP, sugere que estas estirpes resultam de eventos recentes de recombinação genética por redistribuição de segmentos genómicos.

Em 2014, com o apoio da GAVI, Angola irá introduzir no plano nacional de vacinação a vacina contra rotavírus. No Huambo, considerando os resultados de genotipagem obtidos neste trabalho, teoricamente a vacina monovalente Rotarix® conferirá proteção contra aproximadamente 85% dos vírus circulantes e a vacina pentavalente RotaTeq® contra 90%. A nível global, os ensaios clínicos realizados demonstraram que as duas vacinas apresentam graus idênticos de segurança e eficácia (59). Porém, nos países de baixa renda a eficácia da vacina é marcadamente mais reduzida (39% a 77%) que nos países industrializados (80% a 98%) (122). Uma das questões que poderá estar relacionada com este resultado é a diversidade das estirpes de rotavírus que circulam nestes países.

Apesar de no Huambo a grande maioria das infeções ser causada por combinações de genótipos (G1, G2 e P[8]) que estão incluídos numa ou em ambas as vacinas, as linhagens genéticas destes genótipos, identificadas por análise filogenética, são diferentes das usadas nas vacinas aprovadas (Fig. 3.6 A e B). Enquanto o genótipo G1 dos rotavírus do Huambo pertence à linhagem I, o das vacinas Rotarix® e RotaTeq® pertence às linhagens II e III, respetivamente. G2 da vacina RotaTeq® está incluído na linhagem III enquanto os rotavírus G2 analisados são da linhagem II. Por outro lado, os rotavírus do Huambo pertencem à linhagem P[8]-III, enquanto as vacinas compreendem P[8]-I (Rotarix®) e P[8]-II (RotaTeq®).

Alguns estudos sugerem que na proteção contra a infeção por rotavírus é importante não só a imunidade específica de serotipo/genótipo como também a imunidade específica de linhagem.

A resposta de anticorpos neutralizantes induzida pelo genótipo G1 da vacina Rotashield era maior contra estirpes do genótipo G1 da mesma linhagem (121). Um outro estudo com estirpes G9 revelou que uma estirpe da linhagem I induziu mais anticorpos neutralizantes com reatividade cruzada contra G9-II e G9-III que as linhagens II e III contra G9-I (124). No Brasil, a vacina Rotarix® foi introduzida no plano nacional de vacinação em 2006. Subsequentemente, crianças vacinadas foram hospitalizadas com gastroenterite grave causada por rotavírus G1P[6]. A análise genética destas estirpes revelou que, à semelhança das estirpes do Huambo G1P[6], o gene codificador de VP7 pertencia à linhagem G1-I enquanto o da vacina Rotarix® pertence a uma linhagem distinta (G1-II) (125). Ainda, estas estirpes G1P[6] Brasileiras, excetuando para o gene de VP4, não podem ser consideradas heterotípicas uma vez que, à semelhança da estirpe vacinal, possuem uma constelação de genes tipo Wa.

Concluindo, face à elevada prevalência da infecção por rotavírus no Huambo (37,4%) e às características dos genótipos virais circulantes, designadamente elevada prevalência de estirpes G1P[6] pouco comuns e genótipos comuns G1P[8] mas de linhagens genéticas distintas das presentes nas vacinas, na sequência deste trabalho de linha de base, parece-nos ser da maior importância fazer estudos de *follow-up* para estimar a eficácia da vacinação contra rotavírus na prevenção de gastroenterite grave e também fazer a monitorização contínua das estirpes virais circulantes nesta região. Só assim será possível avaliar o impacto da vacina na diversidade e evolução das estirpes, designadamente as de escape imune que possam pôr em causa a eficácia das vacinas atualmente comercializadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Fischer Walker, Christa L., Igor Rudan, Li Liu, Harish Nair, Evropi Theodoratou, Zulfiqar A Bhutta, Katherine L O'Brien, Harry Campbell and Robert E Black.** 2013. Global burden of childhood pneumonia and diarrhea. *Lancet*. Series. 1-12.
2. **F. Lanata, Claudio, Christa L. Fischer-Walker, Ana C. Olascoaga, Carla X. Torres, Martin J. Aryee and Robert E. Black.** 2013. Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children <5 Years of Age: A Systematic Review. *PloS one*. **8**(9): e72788.
3. **Bishop, RF, Davidson GP, Holmes IH, and Ruck BJ.** 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*. **2**(7841): 1281–1283.
4. **Flewett TH, Bryden AS, and Davies H.** 1973. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*. **2**(7844):1497–1497.
5. **Bishop, RF, Davidson GP, Holmes IH, and Ruck BJ.** 1974. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet*. **303**: 149-151.
6. **Kapikian AZ.** 1994. Norwalk and Norwalk-like viruses. *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract*. New York: Marcel Dekker. 2nd ed.
7. **Strauss, James H. and Ellen G. Strauss.** 2002. *Viruses and Human Disease*, Academic Press, Division of Biology California Institute of Technology, Pasadena. California.
8. **Knipe, David M. and Peter M. Howley.** 2007. *Fields Virology*, Wolters Kluwer Health, 5ª edição.
9. **Matthijnssens, Jelle, Max Ciarlet, Sarah M. McDonald, Houssam Attoui, Krisztia'n Ba'nyai, J. Rodney Brister, Javier Buesa, Mathew D. Esona, Mary K. Estes, Jon R. Gentsch, Miren Iturriza-Gómar, Reimar Johne, Carl D. Kirkwood, Vito Martella, Peter P. C. Mertens, Osamu Nakagomi, Viviana Parreno, Mustafizur Rahman, Franco M. Ruggeri, Linda J. Saif, Norma Santos, Andrej Steyer, Koki Taniguchi, John T. Patton, Ulrich Desselberger and Marc Van Ranst.** 2011. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Springer-Verlag*. **156**: 1397–413.
10. **World Health Organization.** 2013. Rotavirus vaccines. *Weekly epidemiological record*. **88**: 49–64.
11. **Bánjai, Kristián, Brigitta László and Jazmin Duqued, A. Duncan Steele, E. Anthony S. Nelsonf, Jon R. Gentschd and Umesh D. Parashard.** 2012. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre

rotavirus era: Insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. Vaccine. A122– A130.

12. **Parashar, Umesh, Duncan Steele, Kathleen Neuzil, Ciro de Quadros, Piyanit Tharmaphornpilas, Fatima Serhan, Mathu Santosham, Manish Patel and Roger Glass.** 2013. Progress with rotavirus vaccines: summary of the Tenth International Rotavirus Symposium. Expert Reviews. **12**: 113-117.

13. **World Health Organization.** 2010. The global burden of disease: 2004 update.

14. **Pesavento, J. B., S. E. Crawford, M. K. Esteves and B. V. Venkatarm Prasad.** 2006. Rotavirus Proteins: Structure and Assembly. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. **309**: 189–219.

15. **Ruiz, Marie Christine, Theresa Leon, Yuleima Díaz and Fabian Michelangeli.** 2009. Molecular Biology of Rotavirus Entry and Replication. TheScientificWorld Journal. **9**: 1476-97.

16. **Greenberg, Harry B. and Mary Esteves.** 2009. Rotaviruses: From Pathogenesis to Vaccination. Gastroenterology. **136**: 1939–1951.

17. **Bioinformatics Portal.** http://viralzone.expasy.org/all_by_species/107.html. 2/1/2013.

18. **Shane D. Trask, Sarah M. McDonald and John T. Patton.** 2012. Structural Insights into the Coupling of Virion Assembly and Rotavirus Replication. Nature Reviews Microbiology. **10**(3): 165–177.

19. **Mahy, Brian W. J. and Marc H. V. Van Regenmortel.** 2010. Desk Encyclopedia Human and Medical Virology, Academic Press, USA.

20. **Hariharan, Jayaram, M. K. Estes and B. V. Venkataram Prasad.** 2004. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. Virus Research. **101**: 67–81.

21. **Jornal Público.** 2013. <http://www.publico.pt/mundo/noticia/26-mortos-em-queda-de-aviao-militar-em-angola-1511940>. 10.3.2014.

22. **Município do Cachiungo.** 2013. <http://www.kachiungo.com/kachiungo/files/municipio.html>. 18.3.2014.

23. **Certest.** 2014. www.certest.es. 2.02.2014.

24. **Sato, K, Inaba Y, Shinozaki T, R. Fugil and M. Matemoto.** 1981. Isolation of human rotavirus in cell cultures. Arch Virol. **69**:155-160.

25. **Londrigan SL, Hewish MJ, Thomson MJ, Sanders GM, Mustafa H. and Coulson BS.** 2000. Growth of rotaviruses in continuous human and monkey cell lines that vary in their expression of integrins. J Gen Virol. **81**(9):2203-13.

26. **Guo CT, Nakagomi O, Mochizuki M, Ishida H, Kiso M, Ohta Y, Suzuki T, Miyamoto D, Hidari KI. and Suzuki Y.** 1999. Ganglioside GM(1a) on the cell surface is involved in the infection by human rotavirus KUN and MO strains. *J Biochem.* **126**(4): 683-8.
27. **Ciarlet M, Crawford SE, Cheng E, Blutt SE, Rice DA, Bergelson JM. and Estes MK.** 2002. VLA-2 (alpha2beta1) integrin promotes rotavirus entry into cells but is not necessary for rotavirus attachment. *J Virol.* **76**(3): 1109-23.
28. **Guerrero CA, Zárate S, Corkidi G, López S and Arias CF.** 2000. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J Virol.* **74**(20): 9362-71.
29. **López S. and CF Arias.** 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* **12**(6): 271-8.
30. **López, S. and C. F. Arias.** 2006. Early Steps in Rotavirus Cell Entry. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. **309**: 39-66.
31. **Baker M. and Prasad BV.** 2010. Rotavirus cell entry. *Curr Top Microbiol Immunol.* **343**: 121-48.
32. **Hu Liya, Sue E Crawford, Joseph M Hyser, Mary K Estes and BV Venkataram Prasad.** 2012. Rotavirus non-structural proteins: structure and function. Elsevier, *Current Opinion in Virology.* **2**: 380–388.
33. **Blutt SE, Kirkwood CD, Parreño V, Warfield KL, Ciarlet M, Estes MK, Bok K, Bishop RF and Conner ME.** 2003. Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event?. *Lancet.* **362**(9394): 1445-9.
34. **Patel M, Rench MA, Boom JA, Tate JE, Sahni LC, Hull JA, Gentsch JR, Parashar UD. and Baker CJ.** 2010. Detection of rotavirus antigenemia in routinely obtained serum specimens to augment surveillance and vaccine effectiveness evaluations. *Pediatr Infect Dis J.* **29**(9): 836-9.
35. **Lynch M, Lee B, Azimi P, Gentsch J, Glaser C, Gilliam S, Chang HG, Ward R. and Glass RI.** 2001. Rotavirus and central nervous system symptoms: cause or contaminant? Case reports and review. *Clin Infect Dis.* **33**(7): 932-8.
36. **Trang NV, Vu HT, Le NT, Huang P, Jiang X. and Anh DD.** 2014. Association between norovirus and rotavirus infection and histo-blood group antigen types in vietnamese children. *J. Clin. Microbiol.* 02927-13.
37. **Huang P, Xia M, Tan M, Zhong W, Wei C, Wang L, Morrow A. and Jiang X.** 2012. Spike protein VP8* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner. *J Virol.* **86**(9): 4833-43.
38. **Ferreira, Wanda F. Canas and João Carlos Sousa.** 2002. *Microbiologia*, Lidel, volume 3, Lisboa.

39. **Rodriguez WJ, Kim HW, Brandt CD, Schwartz RH, Gardner MK, Jeffries B, Parrott RH, Kaslow RA, Smith JI. and Kapikian AZ.** 1987. Longitudinal study of rotavirus infection and gastroenteritis in families served by a pediatric medical practice: clinical and epidemiologic observations. *Pediatr Infect Dis J.* **6**(2): 170-6.
40. **Ruuska T and Vesikari T.** 1990. Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for clinical severity of diarrhoeal episodes. *Scand J Infect Diseases.* **22**: 259-67.
41. **Nakagomi T, Nakagomi O, Takahashi Y, Enoki M, Suzuki T and Kilgore PE.** 2005. Incidence and burden of rotavirus gastroenteritis in Japan, as estimated from a prospective sentinel hospital study. *J Infect Diseases.* **192**: S106-10.
42. **Pott J, Mahlaköiv T, Mordstein M, Duerr CU, Michiels T, Stockinger S, Staeheli P. and Hornef MW.** 2011. IFN-lambda determines the intestinal epithelial antiviral host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**(19): 7944-9.
43. **Barro M. and Patton JT.** 2005. Rotavirus nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of IFN regulatory factor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**(11): 4114-9.
44. **Arnold MM1, Barro M. and Patton JT.** 2013. Rotavirus NSP1 mediates degradation of interferon regulatory factors through targeting of the dimerization domain. *J Virol.* **87**(17): 9813-21.
45. **Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Carter-Campbell S, Glass RI, Estes MK, Pickering LK. and Ruiz-Palacios GM.** 1996. Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med.* **335**(14): 1022-8.
46. **Fischer TK, Valentiner-Branth P, Steinsland H, Perch M, Santos G, Aaby P, Mølbak K. and Sommerfelt H.** 2002. Protective immunity after natural rotavirus infection: a community cohort study of newborn children in Guinea-Bissau, west Africa. *J Infect Dis.* **186**(5): 593-7.
47. **Coulson BS, Grimwood K, Hudson IL, Barnes GL. and Bishop RF.** 1992. Role of coproantibody in clinical protection of children during reinfection with rotavirus. *J Clin Microbiol.* **30**(7): 1678-84.
48. **Johansen K. and Svensson L.** 1997. Neutralization of rotavirus and recognition of immunologically important epitopes on VP4 and VP7 by human IgA. *Arch Virol.* **142**(7): 1491-8.
49. **Herrera D, Vásquez C, Corthésy B, Franco MA. and Angel J.** 2013. Rotavirus specific plasma secretory immunoglobulin in children with acute gastroenteritis and children vaccinated with an attenuated human rotavirus vaccine. *Hum Vaccin Immunother.* **9**(11).
50. **Corthésy B., Benureau Y, Perrier C, Fourgeux C, Parez N, Greenberg H and Schwartz-Cornil I..** 2006. Rotavirus anti-VP6 secretory immunoglobulin A contributes

to protection via intracellular neutralization but not via immune exclusion. *J Virol.* **80**(21): 10692-9.

51. **World Health Organization.** 2008. Manual of rotavirus detection and characterization methods.

52. **Cumino, AC, Giordano MO, Martinez LC, Medeot SI, Pavan JV, Yudowsky S, Isa MB, Depetris AR and Nates SV.** 1998. Culture amplification in human colon adenocarcinoma cell line (CaCo-2) combined with an ELISA as a supplementary assay for accurate diagnosis of rotavirus. *J Virol Methods.* **76**: 81-5.

53. **WHO/UNICEF.** 2006. Oral rehydration salts. http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_FCH_CAH_06.1.pdf. 01/2013.

54. **Patel M, Shane AL, Parashar UD, Jiang B, Gentsch JR. and Glass RI.** 2009. Oral rotavirus vaccines: how well will they work where they are needed most?. *J Infect Dis.* **1**: S39-48.

55. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** 1999. Intussusception among recipients of rotavirus vaccine--United States, 1998-1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **48**(27): 577-81.

56. **Vesikari T, Giaquinto C. and Huppertz HI.** 2006. Clinical trials of rotavirus vaccines in Europe. *Pediatr Infect Dis J.* **1**: S42-7.

57. **World Health Organization.** 2009. Weekly epidemiological record. **84**: 533–540.

58. **Linhares AC1, Velázquez FR, Pérez-Schael I, Sáez-Llorens X, Abate H, Espinoza F, López P, Macías-Parra M, Ortega-Barría E, Rivera-Medina DM, Rivera L, Pavía-Ruz N, Nuñez E, Damaso S, Ruiz-Palacios GM, De Vos B, O’Ryan M, Gillard P. and Bouckennooghe A.** 2008. Efficacy and safety of an oral live attenuated human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in Latin American infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Lancet.* **371**(9619):1181-9.

59. **Soares-Weiser K, Maclehose H, Bergman H, Ben-Aharon I, Nagpal S, Goldberg E, Pitan F and Cunliffe N.** 2012. Vaccines for preventing rotavirus diarrhoea: vaccines in use. *Cochrane Database Syst Rev.* **11**: CD008521.

60. **Kang G, Kelkar SD, Chitambar SD, Ray P. and Naik T.** 2005. Epidemiological profile of rotaviral infection in India: challenges for the 21st century. *J Infect Dis.* **1**: S120-6.

61. **Lopman, Ben A., Daniel C. Payne, Jaqueline E. Tate, Manish M. Patel, Margaret M. Cortese and Umesh D. Parashar.** 2012. Post-licensure experience with rotavirus vaccination in high and middle income countries; 2006 to 2011. *Current Opinion in Virology.* **2**: 434.

62. **GAVI Alliance.** www.gavialliance.org/support/nvs/rotavirus/. 07/10/2013.

63. **Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ, Arrobio JO, Jeffries BC, Stallings EP, Lewis C, Miles AJ, Chanock RM, Kapikian AZ. and Parrott RH.** 1983. Pediatric viral gastroenteritis during eight years of study. *J Clin Microbiol.* **18**(1): 71-8.
64. **Cook SM, Glass RI, LeBaron CW. and Ho MS..** 1990. Global seasonality of rotavirus infections. *Bull World Health Organ.* **68**(2): 171-7.
65. **Centers for Disease Control and Prevention.** <http://www.cdc.gov/rotavirus/about/transmission.html> .7/8/2013.
66. **World Health Organization.** http://www.who.int/topics/rotavirus_infections/en/ .07/8/2013.
67. **World Health Organization.** 2011. Weekly epidemiological record. 86, 317–324.
68. **Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J. and Parashar UD.** 2012. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases.* **12**: 136 – 141.
69. **Wakuda M, Ide T, Sasaki J, Komoto S, Ishii J, Sanekata T. and Taniguchi K.** 2011. Porcine rotavirus closely related to novel group of human rotaviruses. *Emerg Infect Dis.* **17**(8): 1491-3.
70. **Iturriza Gómara, Miren, Cecilia Wong, Sandra Blome, Ulrich Desselberger and Jim Gray.** 2002. Molecular Characterization of VP6 Genes of Human Rotavirus Isolates: Correlation of Genogroups with Subgroups and Evidence of Independent Segregation. *Journal of Virology.* **76**: 6596–6601.
71. **Armah GE, Steele AD, Esona MD, Akran VA, Nimzing L. and Pennap G.** 2010. Diversity of rotavirus strains circulating in west Africa from 1996 to 2000. *J Infect Dis.* **202**: S64-71.
72. **Jere KC, Sawyerr T, Seheri LM, Peenze I, Page NA, Geyer A. And Steele AD.** 2011. A first report on the characterization of rotavirus strains in Sierra Leone. *J Med Virol.* **83**(3): 540-50.
73. **Matthijnssens, Jelle and Marc Van Ranst.** 2012. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. Elsevier. *Current Opinion in Virology.* **2**: 1–8.
74. **Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, Palombo EA, Iturriza-Gómara M, Maes P, Patton JT, Rahman M. and Van Ranst M.** 2008. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol.* **82**(7): 3204-19.
75. **Seheri, Mapaeka, Leah Nemarude, Ina Peenze and Lufuno Netshifhefhe.** 2014. Update of rotavirus strains circulating in Africa from 2007 through 2011. *The Pediatric Infectious Disease Journal.* **33**: 76-84.

76. **Mwenda, Jason M., Jacqueline E. Tate, Umesh D. Parashar, Richard Mihigo, Mary Agócs, Fatima Serhan and Deo Nshimirimana.** 2014. African rotavirus surveillance network. *The Pediatric Infectious Disease Journal.* **33:** S6-S8.
77. **United States Environmental Protection Agency.** 2014. <http://www.epa.gov/microbes/rota.html>. 10.2.2014.
78. **Gouvea, Vera, Roger I. Glass, Patricia Woods, Koki Taniguchi, H. Fred Clark, Barbara Forrester and Zhao-Yin Fang.** 1990. Polymerase Chain Reaction Amplification and Typing of Rotavirus Nucleic ACID from stool Specimens. *Journal of Microbiology.* **28:** 276-282.
79. **Kumar S, Tamura K and Nei M.** MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. 2004. *Brief Bioinform.* **5(2):**150-63.
80. **Prasad BV, Wang GJ, Clerx JP and Chiu W.** 1988. Three-dimensional structure of rotavirus. *J Mol Biol.* **199(2):** 269-75.
81. **Lundgren, O. and L. Svensson.** 2001. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes Infect.* **3(13):** 1145-56.
82. **Uhnou I, Riepenhoff-Talty M, Dharakul T, Chegas P, Fisher JE, Greenberg HB and Ogra PL.** 1990. Extramucosal spread and development of hepatitis in immunodeficient and normal mice infected with rhesus rotavirus. *J Virol.* **64(1):** p. 361-8.
83. **Istrate C, Hinkula J, Charpilienne A, Poncet D, Cohen J, Svensson L and Johansen K.** 2008. Parenteral administration of RF 8-2/6/7 rotavirus-like particles in a one-dose regimen induce protective immunity in mice. *Vaccine.* **26(35):** 4594-601.
84. **Pai, C.H., Shahrabadi M. S. and Ince B..** 1985. Rapid Diagnosis of Rotavirus Gastroenteritis by a Commercial Latex Agglutination Test. *Journal of Clinical Microbiology.* **22:** 846-850.
85. **Simmons MK, Armah G, Asmah R, Banerjee I, Damanka S, Esona M, Gentsch JR, Gray JJ, Kirkwood C, Page N and Iturriza-Gómara M.** 2008. New oligonucleotide primers for P-typing of rotavirus strains: Strategies for typing previously untypeable strains. *Clinical Virology.* **42:** 368-373.
86. **Iturriza Gómara, M., J. J. Gray , D.W.G. Brown and U. Desselberger.** 2004. Characterization of G10P[11] Rotaviruses Causing Acute Gastroenteritis in Neonates and Infants in Vellore, India. *Journal of Clinical Microbiology.* 2541–2547.
87. **Banerjee, I., Ramani S, Primrose B, Iturriza-Gomara M, Gray JJ, Brown DW, and Kang G.** 2007. Modification of rotavirus multiplex RT-PCR for the detection of G12 strains based on characterization of emerging G12 rotavirus strains from South India. *Journal Medical Virology,* **79:** 1413-1421.

88. **Istrate, C., M. Hagbom, E. Vikstrom, K. E. Magnusson and L. Svensson.** 2013. Rotavirus infection increases intestinal motility but not permeability at the onset of diarrhoea. *J Virol.* **88**(6): 3161-9.
89. **Bennett, A., K. G. Eley and G. B. Scholes.** 1968. Effect of prostaglandins E1 and E2 on intestinal motility in the guinea-pig and rat. *Br J Pharmacol.* **34**(3): 639-647.
90. **Thor, P., J. W. Konturek, S. J. Konturek and J. H. Anderson.** 1985. Role of prostaglandins in control of intestinal motility. *Am J Physiol.* **248**(3): G353-359.
91. **Lundgren, O., A. T. Peregrin, K. Persson, S. Kordasti, I. Uhnöo and L. Svensson.** 2000. Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science.* **287**(5452): 491-495.
92. **Kordasti, S., H. Sjövall, O. Lundgren and L. Svensson.** 2004. Serotonin and vasoactive intestinal peptide antagonists attenuate rotavirus diarrhoea. *Gut.* **53**(7): 952-957.
93. **Hagbom, Marie, Sumit Sharma, Ove Lundgren and Lennart Svensson.** 2012. Towards a human rotavirus disease model. *Current Opinion in Virology.* **2**: 1–11.
94. **Glass RI, Parashar U, Patel M, Gentsch J and Jiang B.** 2014. Rotavirus vaccines: successes and challenges. *J Infect.* **68**(1): S9-18.
95. **Mwenda JM, Ntoto KM, Abebe A, Enweronu-Laryea C, Amina I, Mchomvu J, Kisakye A, Mpabalwani EM, Pazvakavambwa I, Armah GE, Seheri LM, Kiulia NM, Page N, Widdowson MA and Steele AD.** 2010. Burden and epidemiology of rotavirus diarrhea in selected African countries: preliminary results from the African Rotavirus Surveillance Network. *J Infect Dis.* **202**: S5-S11.
96. **Odiit A, Mulindwa A, Nalumansi E, Mphahlele MJ, Seheri LM, Mwenda JM and Kisakye A.** 2014. Rotavirus prevalence and genotypes among children younger than 5 years with acute diarrhea at Mulago National Referral Hospital, Kampala, Uganda. *Pediatr Infect Dis J.* **33**:S41-4.
97. **Abebe A, Teka T, Kassa T, Seheri M, Beyene B, Teshome B, Kebede F, Habtamu A, Maake L, Kassahun A, Getahun M, Mitiku K and Mwenda JM.** 2014. Hospital-based surveillance for rotavirus gastroenteritis in children younger than 5 years of age in Ethiopia: 2007-2012. *Pediatr Infect Dis J.* **33**(1):S28-33.
98. **Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS and Glass RI.** 2006. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis.* **12**(2): 304-6.
99. **Kiulia NM, Nyaga MM, Seheri ML, Wolfaardt M, van Zyl WB, Esona MD, Irimu G, Inoti M, Gatinu BW, Njenga PK, Taylor MB and Nyachio A.** 2014. Rotavirus G and P types circulating in the eastern region of Kenya: predominance of G9 and emergence of G12 genotypes. *Pediatr Infect Dis J.* **33**(1): S85-8.

100. **Hjelt K, Grauballe PC, Paerregaard A, Nielsen OH and Krasilnikoff PA.** 1987. Protective effect of preexisting rotavirus-specific immunoglobulin A against naturally acquired rotavirus infection in children. *J Med Virol.* **21**(1): 39-47.
101. **Ebina T, Sato A, Umezu K, Ishida N, Ohyama S, Ohizumi A, Aikawa K, Katagiri S and Katsushima N and Imai A.** 1983. Prevention of rotavirus infection by cow colostrum antibody against human rotaviruses. *Lancet.* **2**(8357): 1029-30.
102. **Berger R, Hadziselimovic F, Just M and Reigel P.** 1983. Effect of feeding human milk on nosocomial rotavirus infections in an infants ward. *Dev Biol Stand.* **53**: 219-28.
103. **Wobudeya E, Bachou H, Karamagi CK, Kalyango JN, Mutebi E and Wamani H.** 2011. Breastfeeding and the risk of rotavirus diarrhea in hospitalized infants in Uganda: a matched case control study. *BMC Pediatr.* **11**: 17.
104. **Tswana, S. A., P. H. Jorgensen, R. W. Halliwell, R. Kapaata and S. R. Moyo** 1990. The incidence of rotavirus infection in children from two selected study areas in Zimbabwe. *Cent Afr J Med.* **36**(10): 241-246.
105. **Nakata, S., Z. Gatheru, S. Ukae, N. Adachi, N. Kobayashi, S. Honma, J. Muli, P. Ogaja, J. Nyangao, E. Kiplagat, P. M. Tukei and S. Chiba.** 1999. Epidemiological study of the G serotype distribution of group A rotaviruses in Kenya from 1991 to 1994. *J Med Virol.* **58**(3): 296-303.
106. **Armah, G. E., A. D. Steele, F. N. Binka, M. D. Esona, R. H. Asmah, F. Anto, D. Brown, J. Green, F. Cutts and A. Hall.** 2003. Changing patterns of rotavirus genotypes in Ghana: emergence of human rotavirus G9 as a major cause of diarrhea in children. *J Clin Microbiol.* **41**(6): 2317-2322.
107. **Potgieter, N., M. C. de Beer, M. B. Taylor and A. D. Steele.** 2010. Prevalence and diversity of rotavirus strains in children with acute diarrhea from rural communities in the Limpopo Province, South Africa, from 1998 to 2000. *J Infect Dis.* **202**: S148-155.
108. **Mukaratirwa, A., C. Berejena, P. Nziramasanga, A. Shonhai, T. S. Mamvura, P. Chibukira, I. Mucheuki, D. Mangwanya, M. Kamupota, P. Manangazira, C. Tapfumaneyi, R. Gerede, M. Munyoro, J. M. Mwenda, J. M. Mphahlele, M. L. Seheri, I. Peenze, A. N. Gonah, A. Maruta and M. B. Tengende.** 2014. Epidemiologic and genotypic characteristics of rotavirus strains detected in children less than 5 years of age with gastroenteritis treated at 3 pediatric hospitals in Zimbabwe during 2008-2011. *Pediatr Infect Dis J.* **33**(1): S45-48.
109. **Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, Banyai K, Ramachandran M, Jain V, Cunliffe NA, Nakagomi O, Kirkwood CD, Fischer TK, Parashar UD, Bresee JS, Jiang B and Glass RI.** 2005. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis.* **192**: S146-59.



110. **Adah MI, Rohwedder A, Olaleye OD and Werchau H.** 1997. Nigerian rotavirus serotype G8 could not be typed by PCR due to nucleotide mutation at the 3' end of the primer binding site. *Arch Virol.* **142**(9): 1881-7.
111. **Espínola EE, Parra GI, Russomando G and Arbiza J.** 2008. Genetic diversity of the VP4 and VP7 genes affects the genotyping of rotaviruses: analysis of Paraguayan strains. *Infect Genet Evol.* **8**(1): 94-9.
112. **Rahman M, Sultana R, Podder G, Faruque AS, Matthijssens J, Zaman K, Breiman RF, Sack DA, Van Ranst M and Azim T.** 2005. Typing of human rotaviruses: nucleotide mismatches between the VP7 gene and primer are associated with genotyping failure. *Virol J.* **2**: 24.
113. **Aladin F, Nawaz S, Iturriza-Gómara M and Gray J.** 2010. Identification of G8 rotavirus strains determined as G12 by rotavirus genotyping PCR: updating the current genotyping methods. *J Clin Virol.* **47**(4): 340-4.
114. **Todd S, Page NA, Duncan Steele A, Peenze I and Cunliffe NA.** 2010. Rotavirus strain types circulating in Africa: Review of studies published during 1997-2006. *J Infect Dis.* **202**: S34-42.
115. **Santos N, Lima RC, Pereira CF and Gouvea V.** 1998. Detection of rotavirus types G8 and G10 among Brazilian children with diarrhea. *J Clin Microbiol.* **36**(9): 2727-9.
116. **Mitui MT, Chandrasena TN, Chan PK, Rajindrajith S, Nelson EA, Leung TF and Nishizono A, Ahmed K.** 2012. Inaccurate identification of rotavirus genotype G9 as genotype G3 strains due to primer mismatch. *Virol J.* **9**: 144.
117. **Matthijssens J1, Bilcke J, Ciarlet M, Martella V, Bányai K, Rahman M, Zeller M, Beutels P, Van Damme P and Van Ranst M.** 2009. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol.* **4**(10): 1303-16.
118. **Rippinger CM, Patton JT and McDonald SM.** 2010. Complete genome sequence analysis of candidate human rotavirus vaccine strains RV3 and 116E. *Virology.* **405**(1): 201-13.
119. **Ghosh S1, Urushibara N, Chawla-Sarkar M, Krishnan T and Kobayashi N.** 2013. Whole genomic analyses of asymptomatic human G1P[6], G2P[6] and G3P[6] rotavirus strains reveal intergenogroup reassortment events and genome segments of artiodactyl origin. *Infect Genet Evol.* **16**: 165-73.
120. **Santos N and Hoshino Y.** 2005. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol.* **15**(1): 29-56.
121. **Jin Q, Ward RL, Knowlton DR, Gabbay YB, Linhares AC, Rappaport R, Woods PA, Glass RI and Gentsch JR.** 1996. Divergence of VP7 genes of G1 rotaviruses isolated from infants vaccinated with reassortant rhesus rotaviruses. *Arch Virol.* **141**(11): 2057-76.

122. **Patel MM, Steele D, Gentsch JR, Wecker J, Glass RI and Parashar UD.** 2011. Real-world impact of rotavirus vaccination. *Pediatr Infect Dis J.* **30**(1): S1-5.
123. **Martella V, Bányai K, Matthijnssens J, Buonavoglia C and Ciarlet M.** 2010. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol.* **140**: 246-55.
124. **Hoshino Y, Jones RW, Ross J, Honma S, Santos N, Gentsch JR and Kapikian AZ.** 2004. Rotavirus serotype G9 strains belonging to VP7 gene phylogenetic sequence lineage 1 may be more suitable for serotype G9 vaccine candidates than those belonging to lineage 2 or 3. *J Virol.* **78**(14): 7795-802.
125. **Rose TL, Marques da Silva MF, Gómez MM, Resque HR, Ichihara MY, Volotão Ede M and Leite JP.** 2013. Evidence of vaccine-related reassortment of rotavirus, Brazil, 2008-2010. *Emerg Infect Dis.* **19**(11): 1843-6.
126. **Yamashiro, Y., T. Shimizu, S. Oguchi and M. Sato.** 1989. Prostaglandins in the plasma and stool of children with rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* **9**(3): 322-327.
127. **Zijlstra, R. T., B. A. McCracken, J. Odle, S. M. Donovan, H. B. Gelberg, B. W. Petschow, F. A. Zuckermann and H. R. Gaskins.** 1999. Malnutrition modifies pig small intestinal inflammatory responses to rotavirus. *J Nutr.* **129**(4): 838-843.

ANEXOS

6. ANEXOS

6.1. Formulário de Informação e Consentimento Informado

	Informação aos pais e formulário de consentimento informado	 REPÚBLICA DE ANGOLA MINISTÉRIO DA SAÚDE
	Epidemiologia da infeção por rotavírus em Huambo, Angola: prevalência da infeção e dos genótipos circulantes	

Qual é o problema que queremos estudar?

Durante a consulta o médico diagnosticou Gastroenterite Aguda (GEA) ao seu filho(a). A GEA é frequente nos primeiros anos de vida e é uma importante causa de doença no país. Com este estudo pretendemos saber se a GEA em crianças é causada por Rotavírus.

O que iremos fazer?

Para detetar o vírus causador da doença, será recolhida uma amostra de fezes ao seu filho(a). A amostra de fezes será analisada da seguinte forma:

1. deteção do rotavírus no Laboratório de análises clínicas, do Centro de Saúde ou do Hospital Municipal onde a colheita foi efetuada.
2. envio da amostra para o laboratório de Virologia no Instituto de Higiene e Medicina Tropical em Lisboa, Portugal, para identificação de tipo de rotavírus.

O médico ou enfermeiro irá fazer algumas perguntas sobre a doença do seu filho.

Serei obrigado(a) a participar na pesquisa?

A participação do seu filho(a) não é obrigatória. Se não quiser participar continuará a ter direito ao tratamento que o médico considerar o melhor. Poderá desistir a qualquer momento.

Risco ou benefícios

A participação do seu filho(a) neste estudo não envolve riscos e é gratuita.

Não há recompensa em dinheiro para participar. O estudo poderá contribuir para conhecer melhor a doença e ajudar a decidir sobre uma vacina que previna esta infeção em Angola.

Confidencialidade

Toda a informação recolhida será mantida secreta (anónima) e apenas o médico e enfermeiro terão acesso aos dados da criança. Os resultados do estudo serão dados ao Centro de Saúde/Hospital Municipal e às autoridades de saúde, serão apresentados em reuniões científicas e poderão ser publicados.

Se tiver alguma dúvida, por favor fale com o profissional de saúde (dependente do local de colheita).

Contactos do profissional de saúde (a designar em cada local de colheita):



Nome:

Morada:

Telefone:

Telefone do gabinete do hospital /centro de saúde:

Páginas: 1/2

	Informação aos pais e formulário de consentimento informado	 REPÚBLICA DE ANGOLA MINISTÉRIO DA SAÚDE
	Epidemiologia da infeção por rotavírus em Huambo, Angola: prevalência da infeção e dos genótipos circulantes	

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO INFORMADO AOS PAIS / RESPONSÁVEL LEGAL

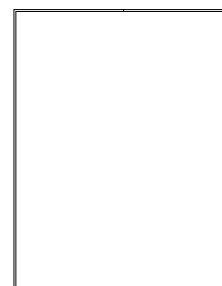
- Recebi uma explicação adequada e esclarecida sobre os objetivos e condições do estudo.
- Compreendi que a participação neste estudo é voluntária, poderei retirar o meu consentimento em qualquer altura e tal não afetará os cuidados médicos normais aos quais o meu filho(a) tem direito.
- Dou o consentimento voluntário da participação do meu filho(a) neste estudo

 Nome criança, em maiúsculas

 Nome do Pai/Mãe/Representante Legal, em maiúsculas

 Assinatura/Impressão digital do Pai/Mãe/Responsável Legal

 Local e Data



EQUIPA DE INVESTIGAÇÃO

- Expliquei aos pais ou representante legal a natureza do estudo.
- Dei uma cópia assinada da *Folha de Informação e Declaração de Consentimento Informado* aos pais ou representante legal.



 Nome do Médico /Enfermeiro do estudo (em maiúsculas)

 Assinatura do Médico /Enfermeiro do estudo

 Data

Páginas: 2/2

6.2. Inquérito Epidemiológico

	Inquérito Epidemiológico – Folha de Trabalho	 REPÚBLICA DE ANGOLA MINISTÉRIO DA SAÚDE
	Epidemiologia da infeção por rotavírus em Huambo, Angola: prevalência da infeção e dos genótipos circulantes	

Preencha os espaços com letras MAIÚSCULAS e coloque uma cruz na resposta correta ☐ **X**

Processo nº _____ Código de laboratório _____

Nome do local de habitação: _____ Concelho _____ Local: Cidade ☐ Outra ☐

Idade: ____ (Anos) ____ (Meses) Data de Nascimento ____/____/____ (Dia / Mês/ Ano)

Sexo M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>	Peso _____ (Kg) Altura _____ (cm) Temperatura _____ °C (Z score) Malnutrição: Ausente <input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderada <input type="checkbox"/> Severa <input type="checkbox"/> Desidratação: sem desidratação <input type="checkbox"/> ligeira <input type="checkbox"/> moderada <input type="checkbox"/> severa <input type="checkbox"/> Estado de atividade da criança: normal <input type="checkbox"/> / reduzido <input type="checkbox"/>
--	--

A criança está a ser amamentada: Sim ☐ / Não ☐

Se SIM, durante amamentação comeu outros alimentos: Sim ☐ / Não ☐

A criança sofre de alguma doença crónica? Sim ☐ / Não ☐

Se SIM qual o nome da doença _____

Data de início dos sintomas de GEA ____/____/____ (Dia / Mês/ Ano)

A criança tem tido febre: Sim ☐ / Não ☐ Duração: _____ dias

A criança tem tido diarreia: Sim ☐ / Não ☐

Se SIM, quantas vezes por dia _____ Duração: _____ dias

A criança tem tido vômitos: Sim ☐ / Não ☐

Se SIM, quantas vezes por dia vomita _____ Duração: _____ dias

Data de colheita da amostra: ____/____/____ (Dia / Mês)

Assinatura do Médico/Enfermeiro/ _____

Resultados da análise laboratorial:

Teste Rápido para Rotavírus: Positivo <input type="checkbox"/> / Negativo <input type="checkbox"/> / Inválido <input type="checkbox"/>

Assinatura do Médico/Técnico do Laboratório _____

Data ____/____/____ (Dia / Mês / Ano)

6.3. Resultados obtidos na 1ª e 2ª hemi-nested multiplex PCR a partir das sequências parciais codificantes de VP7 e VP4

Nº amostra RV +	VP7, 1ª PCR	VP7, 2ª PCR (Genótipo G)	VP4, 1ª PCR	VP4, 2ª PCR (Genótipo P)
1	Positivo	G1	Positivo	P8/P9
2	Positivo	G1	Positivo	P8
3	Positivo	G1	Positivo	P8/P9
4	Positivo	NT	Positivo	P6/P8/P9
5	Positivo	NT	Positivo	P8
6	Positivo	G1	Positivo	P8/P9
7	Positivo	G1	Positivo	P8/P9
8	Negativo	G1	Negativo	NT
9	Positivo	G1	Positivo	NT
10	Positivo	G1	Positivo	P6/P11
11	Positivo	G1	Positivo	P8/P9
12	Positivo	G1	Positivo	P8/P9
13	Positivo	G1	Positivo	P8
14	Positivo	G1	Positivo	P8/P9
15	Positivo	G1	Positivo	P4/P6/P8/P11
16	Positivo	G2	Positivo	P4/P10
17	Positivo	G1	Positivo	P8
18	Positivo	G1	Negativo	P6/P8
19	Positivo	G1	Positivo	P8
20	Positivo	G12	Positivo	P4/P6/P8
21	Positivo	G1	Negativo	P6/P8
22	Positivo	G1	Positivo	P6/P8
23	Positivo	G12	Positivo	P6/P8
24	Positivo	G1	Positivo	P8/P9
25	Positivo	G1	Positivo	P8
26	Positivo	G1	Positivo	P6/P8
27	Positivo	G2	Positivo	P4
28	Negativo	NT	Positivo	P6/P10
29	Positivo	G2	Positivo	P4
30	Positivo	G1	Positivo	P8
31	Positivo	G1	Positivo	P8
32	Positivo	G1	Positivo	P6/P10
33	Positivo	G1/G2/G12	Positivo	P4/P8
34	Positivo	G1	Positivo	P6/P8
35	Positivo	G1	Positivo	P6/P8
36	Positivo	G1	Negativo	NT
37	Positivo	G1	Positivo	P8
38	Positivo	G1	Positivo	P6/P8/P11

Nº amostra RV +	VP7, 1º PCR	VP7, 2º PCR (Genótipo G)	VP 4, 1 º PCR	VP4, 2º PCR (Genótipo P)
39	Positivo	G1/G3/G12	Positivo	NT
40	Positivo	G1	Positivo	P8/P9
41	Positivo	G1	Positivo	P8
42	Positivo	G1	Positivo	P8
43	Positivo	G1	Negativo	P4/P6/P11
44	Positivo	G1	Positivo	P8
45	Positivo	G1/G2	Positivo	P8
46	Positivo	G1	Positivo	P8
47	Positivo	G9	Positivo	NT
48	Positivo	G1	Positivo	P8
49	Positivo	G1	Positivo	P6/P8/P11
50	Positivo	G1	Positivo	P8/P10
51	Positivo	G1	Positivo	P6
52	Positivo	G1	Positivo	P8/P9
53	Positivo	G1	Positivo	P8/P9
54	Positivo	G1	Positivo	P4/P6/P8/P9/P11
55	Positivo	G1	Positivo	P6
56	Positivo	G1	Positivo	P8/P10
57	Positivo	G1	Positivo	P8/P10
58	Positivo	G1	Positivo	NT
59	Positivo	G1	Positivo	NT
60	Positivo	G1	Positivo	NT
61	Positivo	G12	Positivo	NT
62	Positivo	G1	Positivo	P8/P10
63	Positivo	G1	Positivo	P8/P10
64	Positivo	G1	Positivo	NT
65	Positivo	G1	Positivo	P8/P10
66	Positivo	G1	Positivo	NT
67	Positivo	G1	Positivo	P6/P8/P10
68	Positivo	G1	Positivo	P8
69	Positivo	G1	Positivo	P8
70	Positivo	G12	Positivo	P4/P6/P8
71	Positivo	G1/G2	Positivo	P4/P6
72	Positivo	G1	Positivo	P8
73	Positivo	G1	Positivo	P6/P8
74	Positivo	G1	Positivo	P4/P6
75	Positivo	G1	Positivo	P4/P8
76	Positivo	G9	Positivo	NT
77	Positivo	G1	Positivo	P8/P9
78	Positivo	G1	Positivo	P6/P11
79	Positivo	G1	Positivo	P8/P9

Nº amostra Rotavírus +	VP7, 1º PCR	VP7, 2º PCR (Genótipo G)	VP 4, 1 º PCR	VP4, 2º PCR (Genótipo P)
80	Positivo	G4	Positivo	P4/P6/P8
81	Positivo	G1	Positivo	P4/P6/P11
82	Positivo	G1	Positivo	P8
83	Positivo	G1	Positivo	NT
84	Positivo	G1	Positivo	NT
85	Positivo	G1/G2	Positivo	NT
86	Positivo	G1	Positivo	NT
87	Positivo	G1	Positivo	P8
88	Positivo	G1	Positivo	NT
89	Positivo	G2/G12	Positivo	P4
90	Positivo	G1	Positivo	NT
91	Positivo	G1	Positivo	P8/P9
92	Positivo	G1	Positivo	P4/P6

6.4. Resultados preliminares obtidos por BLAST após sequenciação dos produtos amplificados de VP4

Amostra	Corte (nt)	Genótipo	Nº Acesso	País	Query	Identidade
4	150-631	P[6]	JQ693567	Brasil	100%	99%
			JQ693566	Brasil	100%	99%
5	27-620	P[8]	HQ392119	Bélgica	100%	99%
			HM773747	EUA	100%	99%
9	29-622	P[6]	JQ693567	Brasil	100%	99%
			JQ693566	Brasil	100%	99%
10	30-623	P[6]	JQ693567	Brasil	100%	99%
			JQ693566	Brasil	100%	99%
11	28-622	P[8]	HQ392119	Bélgica	100%	99%
			HM773747	EUA	100%	99%
15	30-620	P[6]	DQ005122	Bélgica	99%	98%
			HQ405382	Madagáscar	99%	98%
16	31-627	P[4]	JX154455	B. Faso	99%	99%
			JX154454	B. Faso	99%	99%
20	33-629	P[6]	JQ693567	Brasil	99%	99%
			JQ693566	Brasil	99%	99%
22	175-624	P[6]	JQ693567	Brasil	100%	99%
			JQ693566	Brasil	100%	99%
28	30-623	P[6]	JQ693567	Brasil	100%	99%
			JQ693566	Brasil	100%	99%
32	36-631	P[6]	JQ693567	Brasil	99%	99%
			JQ693566	Brasil	99%	99%
33	35-626	P[8]	HQ392119	Bélgica	100%	99%
			HM773747	EUA	100%	99%
35	35-631	P[6]	JQ693567	Brasil	99%	99%
			JQ693566	Brasil	99%	99%
38	32-625	P[6]	JQ693567	Brasil	100%	99%
			JQ693566	Brasil	100%	99%
39	-	-	-	-	-	-
43	193-627	P[6]	JQ693567	Brasil	99%	99%
			JQ693566	Brasil	99%	99%
45	-	-	-	-	-	-
47	34-630	P[6]	JQ693567	Brasil	99%	99%
			JQ693566	Brasil	99%	99%
49	56-631	P[6]	JQ693567	Brasil	99%	99%
			JQ693566	Brasil	99%	99%
50	20-621	P[8]	HQ392119	Bélgica	100%	99%
			HM773747	EUA	100%	99%
51	34-627	P[6]	JQ693567	Brasil	100%	99%
			JQ693566	Brasil	100%	99%
52	38-622	P[8]	HQ392119	Bélgica	100%	99%
			HM773747	EUA	100%	99%
53	30-622	P[8]	HQ392119	Bélgica	100%	99%
			HM773747	EUA	100%	99%

Amostra	Corte (nt)	Genótipo	Nº Acesso	País	Query	Identidade
54	30-626	P[6]	JQ693567	Brasil	99%	99%
			JQ693566	Brasil	99%	99%
55	31-627	P[6]	JQ693567	Brasil	99%	99%
			JQ693566	Brasil	99%	99%
56	30-622	P[8]	HQ392119	Bélgica	100%	99%
			HM773747	EUA	100%	99%
57	31-623	P[8]	HQ392119	Bélgica	100%	99%
			HM773747	EUA	100%	99%
58	90-626	P[6]	JQ693567	Brasil	99%	99%
			JQ693566	Brasil	99%	99%
59	40-627	P[6]	JQ693567	Brasil	99%	99%
			JQ693566	Brasil	99%	99%
60	80-626	P[6]	JQ693567	Brasil	99%	99%
			JQ693566	Brasil	99%	99%
61	90-628	P[6]	JQ693567	Brasil	99%	99%
			JQ693566	Brasil	99%	99%
64	32-628	P[6]	JQ693567	Brasil	99%	99%
			JQ693566	Brasil	99%	99%
65	30-622	P[8]	HQ392119	Bélgica	100%	99%
			HM773747	EUA	100%	99%
66	29-621	P[8]	HQ392119	Bélgica	100%	99%
			HM773747	EUA	100%	99%
67	28-621	P[6]	JQ693567	Brasil	100%	99%
			JQ693566	Brasil	100%	99%
70	44-625	P[6]	JQ693567	Brasil	100%	99%
			JQ693566	Brasil	100%	99%
71	34-626	P[4]	JX154455	B. Faso	100%	99%
			JX154454	B. Faso	100%	99%
74	33-626	P[6]	JQ693567	Brasil	100%	99%
			JQ693566	Brasil	100%	99%
76	34-624	P[6]	KC152908	Itália	99%	99%
			JF460815	Bélica	99%	99%
78	32-625	P[6]	JQ693567	Brasil	100%	99%
			JQ693566	Brasil	100%	99%
80	33-625	P[6]	JQ693567	Brasil	100%	99%
			JQ693566	Brasil	100%	99%
81	274-589	P[6]	JQ693567	Brasil	100%	99%
			JQ693566	Brasil	100%	99%
84	33-629	P[6]	KC152908	Itália	99%	99%
			JF460815	Bélica	99%	99%
89	32-624	P[4]	JX154455	B. Faso	100%	99%
			JX154454	B. Faso	100%	99%
90	40-624	P[6]	JQ693567	Brasil	99%	99%
			JQ693566	Brasil	99%	99%
92	42-610	P[6]	JQ693567	Brasil	100%	99%
			JQ693566	Brasil	100%	99%

6.5. Resultados preliminares obtidos por BLAST após sequenciação dos produtos amplificados de VP7

Amostra	Corte (nt)	Genótipo	Nº Acesso	País	Query	Identidade
4	25-750	G12	JN711097	EUA	100%	99%
			AB527045	Siri Lanka	100%	99%
5	20-735	G1	KC510182	Alemanha	98%	99%
			HQ392100	EUA	100%	99%
8	111-725	G1	KC510182	Alemanha	99%	100%
			HQ392100	EUA	99%	99%
9	20-710	G1	KC510182	Alemanha	98%	99%
			AB553328	India	100%	99%
10	21-735	G1	KC510182	Alemanha	98%	99%
			AB553328	India	100%	99%
11	23-720	G1	KC510182	Alemanha	98%	99%
			AB553328	India	100%	98%
15	21-735	G1	KC510182	Alemanha	98%	99%
			AB553328	India	100%	99%
16	18745	G2	JX154537	B. Faso	99%	99%
			JX154536	B. Faso	99%	99%
20	21-746	G8	HM067602	França	100%	99%
			JQ693565	Brasil	99%	98%
23	22-719	G8	HM067602	França	100%	99%
			JQ693565	Brasil	100%	99%
28	21-735	G1	KC510182	Alemanha	98%	99%
			AB553328	India	100%	99%
32	21-735	G1	KC510182	Alemanha	98%	99%
			AB553328	India	100%	99%
33	65-540	G1	KC510182	Alemanha	100%	99%
			KF113017	China	100%	99%
38	20-710	G1	KC510182	Alemanha	98%	99%
			AB553328	India	100%	99%
39	24-706	G12	JN711097	EUA	100%	99%
			AB527045	Siri Lanka	100%	99%
43	31-736	G1	KC510182	Alemanha	99%	99%
			AB553328	India	100%	99%
45	-	-	-	-	-	-
47	21-735	G9	JN605409	África Sul	99%	99%
			HQ849458	Líbia	99%	99%
49	20-735	G1	KC510182	Alemanha	98%	99%
			HQ392100	EUA	100%	99%
50	21-736	G1	KC510182	Alemanha	98%	99%
			HQ392100	EUA	100%	99%
51	30-721	G1	KC510182	Alemanha	99%	99%
			AB553328	India	97%	99%
52	20-715	G1	KC510182	Alemanha	98%	99%
			AB553328	India	99%	99%
53	20-714	G1	KC510182	Alemanha	98%	99%
			AB553328	India	100%	98%
54	54-713	G1	KC510182	Alemanha	100%	99%
			AB553328	India	100%	99%

Amostra	Corte (nt)	Genótipo	Nº Acesso	País	Query	Identidade
55	21-722	G1	KC510182	Alemanha	98%	99%
			AB553328	India	100%	99%
58	21-736	G1	KC510182	Alemanha	98%	99%
			AB553328	India	100%	99%
59	18-709	G1	KC510182	Alemanha	98%	99%
			AB553328	India	100%	99%
60	20-735	G1	KC510182	Alemanha	98%	99%
			AB553328	India	100%	99%
61	19-782	G8	HM067602	França	100%	99%
			JQ693565	Brasil	99%	98%
64	21-735	G1	KC510182	Alemanha	98%	99%
			AB553328	India	100%	99%
66	22-734	G1	KC510182	Alemanha	98%	99%
			HQ392100	EUA	100%	99%
67	19-710	G1	KC510182	Alemanha	98%	99%
			AB553328	India	100%	99%
70	22-711	G8	HM067602	França	100%	99%
			JQ693565	Brasil	100%	98%
71	22-616	G2	JX154537	B. Faso	100%	100%
			JX154536	B. Faso	100%	100%
73	18-732	G1	KC510182	Alemanha	98%	99%
			AB553328	India	100%	99%
75	56-715	G1	KC510182	Alemanha	100%	99%
			AB553328	India	100%	99%
76	28-717	G9	JN605409	África Sul	100%	99%
			HQ849458	Líbia	100%	99%
80	51-704	G12	JN711097	EUA	100%	99%
			AB527045	Siri Lanka	100%	99%
84	18-732	G1	KC510182	Alemanha	98%	99%
			AB553328	India	100%	99%
85	19-733	G1	KC510182	Alemanha	98%	99%
			AB553328	India	100%	99%
86	19-710	G1	KC510182	Alemanha	98%	99%
			AB553328	India	100%	99%
89	14-706	G2	JX154537	B. Faso	99%	99%
			JX154536	B. Faso	99%	99%